

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Bioquímica



TESIS DOCTORAL

Nucleotido-cíclico ciclasas del díptero *ceratitis capitata*

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR
PRESENTADA POR

José Luis García López

Madrid, 2015

José Luis García López

TP
1981
115



7 - 53 - 041228 - 7

NUCLEOTIDO-CICLICO CICLASAS DEL DIPTERO CERATITIS CAPITATA

Departamento de Bioquímica
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Complutense de Madrid
1981



BIBLIOTECA

© José Luis García López
Edita e imprime la Editorial de la Universidad
Complutense de Madrid. Servicio de Reprografía
Noviciado, 3 Madrid-8
Madrid, 1981
Xerox 9200 XB 480
Depósito Legal: M-13971-1981

Autor: JOSE LUIS GARCIA LOPEZ

NUCLEOTIDO-CICLICO CICLASAS DEL DIPTERO
CERATITIS CAPITATA

Director: Prof. D. Angel Martín Municio
Catedrático-Director del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid.

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Ciencias Químicas
Departamento de Bioquímica

1980

"A mis padres"

"A Begoña"

Esta investigación se ha desarrollado en el Departamento de Bioquímica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del Prof. D. Angel Martín Municio, a quien deseo expresar mi agradecimiento por su constante apoyo y ayuda.

Igualmente quiero expresar mi agradecimiento por su colaboración a Amador Haro, Susana Periañez, Dr. Edgardo Catalán, Dra. M^a Pilar Castellón, así como a todos los compañeros del laboratorio quienes de alguna manera han contribuido a la realización de este trabajo.

INDICE

	<u>Página</u>
<u>1. INTRODUCCION</u>	
1.1. Introducción	2
1.2. Adenilato ciclasa	3
1.2.1. Distribucción	3
1.2.2. El componente catalítico y su actividad	5
1.2.3. Regulación por cationes divalentes	9
1.2.4. Regulación por calcio :.....	10
1.2.5. Regulación por F^{-}	14
1.2.6. Regulación por otros iones	21
1.2.7. Regulación por GTP	24
1.2.8. Regulación por hormonas, neurotransmisores y drogas .	34
1.2.9. Regulación por adenosina	41
1.2.10. Actuación de la toxina colérica	49
1.2.11. Regulación por prostaglandinas	52
1.2.12. Importancia de los lípidos	55
1.2.13. La adenilato ciclasa en bacterias	57
1.2.14. Desarrollo y diferenciación	61
1.3. Guanilato ciclasa	67
1.3.1. Distribucción	67
1.3.2. Estructura	68
1.3.3. Características cinéticas	69
1.3.4. Regulación por cationes	71
1.3.5. Regulación por oxidación y reducción	72
1.3.6. Hormonas y otros agentes moduladores	78
1.3.7. Regulación por lípidos	80
1.3.8. cGMP y proliferación	83
1.4. Adenilato y guanilato ciclasa en insectos	85
<u>2. MATERIALES Y METODOS</u>	
2.1. Materiales	94

	<u>página</u>
2.2. Material biológico	97
2.3. Obtención de cabezas del insecto adulto	97
2.4. Preparaciones de membrana	98
2.5. Determinación de actividades enzimáticas	100
2.5.1. Adenilato ciclasa	100
2.5.1.1. Ensayo cromatográfico	100
2.5.1.2. Ensayo por técnica de competencia y unión específica	101
2.5.2. Guanilato ciclasa	102
2.5.3. Proteína receptora de cAMP	104
2.5.4. Fosfoproteína-fosfatasa	104
2.5.5. Proteína quinasa	105
2.5.6. Actividad ATPásica	107
2.6. Tratamiento térmico	108
2.7. Tratamiento triptico	109
2.8. Tratamiento con Fosfolipasa A ₂	110
2.9. Cromatografía en capa fina de nucleótidos	111
2.10. Análisis de lípidos	112
2.10.1. Extracción de lípidos totales. Método de Bligh y Dyer	112
2.10.2. Obtención de fosfolípidos totales	113
2.10.3. Determinación de Fósforo en Fosfolípidos	114
2.10.4. Determinación de colesterol en lípidos totales	115
2.11. Purificación parcial de la adenilato ciclasa	116
2.11.1. Solubilización	116
2.11.3. Cromatografía en DEAE-celulosa	118
2.11.4. Concentración por diálisis	118
2.11.5. Cromatografía en ultrogel AcA 22	120
2.11.6. Conservación de la proteína soluble	120
2.11.7. Determinación del peso molecular aparente	121

	<u>Página</u>
2.12. Purificación parcial de la proteína receptora de cAMP	122
2.12.1. Homogeneización	122
2.12.2. Precipitación ácida	123
2.12.3. Precipitación con sulfato amónico	123
2.12.4. Biogel HTP	123
2.12.5. Concentración por diálisis	124
2.12.6. Diálisis	124
2.12.7. Sephadex G-100	125
2.12.8. Sephadex G-200	125
2.12.9. Conservación	126
2.13. Valoración de proteínas	126
2.13.1. Método de Lowry	126
2.13.2. Método de Dulley y Grieve	127
2.14. Preparación de los soportes cromatográficos	128
2.14.1. Dowex	128
2.14.2. DEAE-celulosa	128
2.14.3. Alúmina	129
2.14.4. Biogel HTP	129
2.14.5. Ultrogel	130
2.14.6. Sephadex	130
2.14.7. Bio-Beads SM-2	130
2.14.8. Blue-Sepharosa CL-6B	131
2.15. Líquidos de centelleo	131
2.16. Condiciones de contaje	132
2.17. Cálculo de la actividad de adenilato ciclasa	132
 3. <u>RESULTADOS Y DISCUSION</u>	
3.1. Condiciones de ensayo	136
3.1.1. Adenilato ciclasa	136
3.1.1.1. Ensayo cromatográfico	136

	<u>Página</u>
3.1.1.1.1. Comprobación de la pureza del producto final ...	138
3.1.1.1.2. Condiciones generales de ensayo	140
3.1.1.2. Ensayo por competencia de unión específica	145
3.1.2. Proteína receptora de cAMP	148
3.2. Guanilato ciclasa	150
3.3. Proteína receptora de cAMP.....	151
3.3.1. Purificación	151
3.3.2. Especificidad	154
3.3.3. Significación biológica	155
3.4. Adenilato ciclasa	160
3.4.1. Adulto farato	160
3.4.1.1. Efecto de los cationes divalentes	161
3.4.1.2. Efecto del fluoruro	164
3.4.1.3. Efecto del Ca^{2+}	169
3.4.1.4. Efecto del EGTA y del EDTA	171
3.4.1.5. Efecto del GTP	174
3.4.1.6. Efecto de la adenosina	175
3.4.1.7. Efecto de la azida sódica	178
3.4.1.8. Efecto de la fuerza iónica	180
3.4.2. Cabeza del insecto adulto	182
3.4.2.1. Distribución en subfracciones	182
3.4.2.2. Efecto de los cationes divalentes	186
3.4.2.3. Efecto del fluoruro y otros iones	191
3.4.2.4. Efecto del calcio	201
3.4.2.5. Efecto de la adenosina	203
3.4.2.6. Efecto del GTP	211
3.4.2.7. Efecto de los neurotransmisores	218
3.4.2.8. Efecto de otros posibles moduladores	231
3.4.2.9. Solubilización y purificación	235
3.4.2.9.1. Solubilización	235

- VIII -

	<u>Página</u>
3.4.2.9.2. Purificación	248
3.4.2.9.3. Determinación del peso molecular aparente	254
3.4.2.10. Desactivación térmica	258
3.4.2.11. Tratamiento con tripsina	264
3.4.2.12. Tratamiento con fosfolipasa A ₂	268
3.4.2.13. Estudio del efecto de un inhibidor endógeno	275
 4. <u>CONCLUSIONES</u>	 279
 5. <u>BIBLIOGRAFIA</u>	 284

1. INTRODUCCION

1.1. INTRODUCCION

Con el descubrimiento del cAMP (3',5'-monofosfato de adenosina) por Rall y Sutherland (1-3) en 1957 se abrió una nueva era dentro de la bioquímica moderna: "la bioquímica del segundo mensajero". Un concepto que en apenas 20 años ha esclarecido fundamentalmente la comprensión de la compleja regulación del metabolismo celular. Con el hallazgo de este "extraño" nucleótido se dio solución a un antiguo problema, ¿cómo podía una hormona polipeptídica transmitir su mensaje al interior de la célula sin atravesar la membrana?. Ya en los primeros experimentos se apreció la existencia de una estrecha correlación entre la estimulación por epinefrina y glucagón y la aparición de cAMP en el medio. Con el descubrimiento en 1962 de la enzima responsable de la biosíntesis del nucleótido adenilato ciclase (ATP pirofosfato-liasa ciclante, EC 4.6.1.1) (4-7) y la demostración de su regulación "in vitro" por hormonas y neurotransmisores se cerró todo un capítulo de especulaciones y teorías en el campo de la regulación endocrina. Un segundo nucleótido cíclico, el cGMP (3',5'-monofosfato de guanosina), fue detectado en 1963 por Ashman y col (8) en la orina de rata. Igual que con el anterior, las especulaciones acerca de su verdadera implicación en el metabolismo celular no cesaron hasta que se confirmó en 1969 la existencia de una enzima capaz de biosintetizarlo (9-12), la guanilato ciclase (GTP-pirofosfato-liasa ciclante EC 4.6.1.2.).

El grupo de Bloch (16) está trabajando para sentar las bases de la presencia en la célula de un nuevo nucleótido cíclico, el cCMP (3',5'-monofosfato de citidina), presencia que ha sido detectada por radioinmunoensayo (17) y en parte confirmado por la caracterización previa de una enzima con actividad de citidilato ciclase (CTP pirofosfato-liasa ciclante EC 4.6.1.3) (18).

La presencia en el medio de otros nucleótidos y la baja proporción de los nucleótidos cíclicos, ha venido condicionando estos estudios a la disponibilidad de métodos sensibles y resolutivos como las técnicas de radioinmunoensayo (13) competencia de unión específica (14), y procesos de separación cromatográfica (15).

Los trabajos encaminados a la detección, purificación y caracterización de las proteína quinasas y fosfodiesterasas dependientes de cAMP y cGMP, así como de proteínas que los unen selectivamente, completan el esquema metabólico del que son participes estos nucleótidos.

A este, ya de por sí, complejo sistema se ha sumado en los últimos años un nuevo elemento, el calcio, cuya importancia como segundo mensajero ha planteado ya serios problemas a la hora de juzgar su relación con ambos nucleótidos.

En los capítulos que a continuación se desarrollan se expondrán las características más sobresalientes de las enzimas encargadas de la biosíntesis del cAMP y cGMP, haciendo especial hincapié en los aspectos que atañen a su regulación.

1.2. ADENILATO CICLASA

1.2.1. DISTRIBUCION

El cAMP y la adenilato ciclasa se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza y así es posible encontrarlos en todo el reino animal (19), tanto vertebrados como invertebrados, protozoos (20, 21), hongos (22, 23), levaduras (24, 25) y bacterias (26). Si en estos seres vivos nadie discute la presencia tanto del cAMP como de la adenilato ciclasa, no ocurre así con las denominadas plantas superiores, donde todavía hoy se discute la validez de los métodos utilizados para detectar tanto la

presencia del cAMP como la de las enzimas implicadas en su metabolismo (27-29).

En casi todos los tejidos y células de mamíferos hasta ahora estudiados se ha demostrado la presencia del cAMP y de adenilato ciclasa, con excepción de algunos eritrocitos (4) y algunas líneas celulares (30, 31). Evidentemente, cada tejido mantiene unas características propias relativas a su actividad basal. Más aún, cada célula posee un espectro distinto de respuesta hormonal.

Desde los primeros estudios (4), la actividad de adenilato ciclasa se observó estrechamente asociada a la fracción sedimentable de los tejidos homogeneizados. Rodbell (32) fue el primero que estableció que la actividad de algunas hormonas era reflejo de la respuesta de la adenilato ciclasa a las mismas en membranas plasmáticas de adipocitos. Estas preparaciones no estaban contaminadas con otras estructuras y se pudo concluir que la enzima estaba asociada a las membranas. En apoyo de este hecho Wolff y Jones (33) observaron en membranas de tiroides bovino, que la adenilato ciclasa copurifica con la $(Na^+ - K^+)ATPasa$ y 5'-nucleotidasa enzimas admitidas como marcadores de membrana.

En cerebro, la actividad más elevada se encuentra asociada a las fracciones ricas en sinaptosomas (34).

En bacterias también se encuentra la enzima asociada a la membrana pero la unión no parece ser excesivamente fuerte, ya que en muchas ocasiones ha sido posible solubilizarla sólo por tratamiento con soluciones tampón (26). En este mismo caso se puede encontrar la enzima soluble de testículo de rata (35).

Aunque, en general, se admite que la enzima se halla unida a la membrana plasmática (36) no falta quien afirma que también puede hallarse asociada a otras estructuras membranosas como sistema T (37), núcleos (38, 39) y mitocondrias (40-43). Sin embargo, estos resultados son dudosos, ya que es difícil precisar

si la actividad se debe a una contaminación parcial con restos de membrana plasmática.

1.2.2. EL COMPONENTE CATALITICO Y SU ACTIVIDAD

La conversión enzimática del ATP en cAMP se describió por primera vez; en detalle, en una serie de trabajos de Sutherland y col (4-7) en 1962. La enzima requiere ATP y Mg^{2+} para expresar su actividad.

La reacción implica la conversión de una molécula de ATP, probablemente como complejo ATP-Mg, en una molécula de cAMP y otra de pirofosfato. La constante de equilibrio calculada es menor que la unidad. Esto, entre otras cosas, significa que la reacción catalizada por la adenilato ciclasa puede ser reversible, y de hecho ha sido demostrado por varios investigadores (44-47). Aunque como han propuesto Hayaishi y col (45) en condiciones fisiológicas las concentraciones de cAMP, ATP y PPI hacen imposible la reacción inversa.

Los estudios más completos acerca de los parámetros catalíticos de la enzima han sido realizados por Kurashina y col (48) con la enzima de Brevibacterium liquefaciens previamente purificada hasta homogeneidad (49). Según dichos autores el valor de la energía libre estandar ($\Delta G^{\circ'}$) para la conversión del ATP en cAMP y PPI, a 25°C y en presencia de 5 mM de Mg^{2+} , varía de 0.8-2.1 kcal mol⁻¹ en el intervalo de pH 7.7-6.2. Los valores de entropía y entalpía son:

pH	$\Delta H^{\circ'}$ (Kcal/mol)	S° (u.e)
7.0	4.8	10.7
7.3	5.0	12.4

Otros parámetros obtenidos a 25°C y pH 7.3 son K_{ATP} , 0.074 mM y V_{max} de la reacción directa, 1.64 $\mu\text{mol min}^{-1}\text{mg}^{-1}$; K_{ppi} 2.0 mM; K_{cAMP} 9.3 mM y V_{max} para la reacción inversa 1.7 μmoles

$\text{min}^{-1}\text{mg}^{-1}$.

A partir de estos datos se puede estimar que la energía libre de hidrólisis (ΔG°) a pH 7.5 y 25°C del enlace 3'-éster del cAMP es de $-11.6 \text{ Kcal mol}^{-1}$, siendo el valor de ΔH° $-8.7 \text{ Kcal mol}^{-1}$. Sin embargo, según Greengard y col (50) este valor medido calorimetricamente es $-14.1 \text{ Kcal mol}^{-1}$. Basado en esta elevada energía libre de hidrólisis se sugirió en su día que el cAMP podría servir como agente adenilante de las proteínas (44).

El pH óptimo de la actividad enzimática para la reacción directa está comprendido entre 7 y 9, y para la reacción inversa entre 6.8 y 7.3.

La adenilato ciclasa de Brevibacterium liquefaciens, puede utilizar como sustrato -además del ATP- el dATP y otros sustratos sintéticos como App(NH)p y App(CH₂)p, los cuales tienen la ventaja de no ser metabolizados por las ATPasas, lo que les hace muy útiles cuando estas actividades son muy altas en el tejido o sistema de que se trate. Es de destacar aquí que la velocidad más alta se consigue con el dATP y no con el ATP, aunque por supuesto, ambas son muy parecidas.

Esta enzima bacteriana puede funcionar indistintamente con Mg^{2+} y Mn^{2+} como metales más importantes, si bien, Co^{2+} , Zn^{2+} , Ba^{2+} , Cd^{2+} y Fe^{2+} pueden satisfacer, aunque en menor medida, los requerimientos catalíticos. Ahora bien, en general, en lo que respecta a los cationes son Mg^{2+} , Mn^{2+} y Co^{2+} los que pueden dar cuenta de la actividad enzimática, en tanto que Ca^{2+} , Zn^{2+} y Cu^{2+} son inhibidores (51).

La concentración del metal ha de ser siempre superior a la del ATP, ya que se ha comprobado que cuando esto no ocurre, el ATP se comporta como inhibidor (51); hecho que ha dado origen a algunas teorías que más adelante se discutirán al tratar de la activación por metales.

Los datos obtenidos en otros sistemas no purificados están condicionados por las perturbaciones del entorno y las con

diciones propias del tejido y del ensayo utilizado..

En cuanto a las características estructurales de este componente catalítico hay que hacer clara distinción de su procedencia y así comentaremos por separado sus propiedades en eucariontes y procariontes.

En procariontes, y en particular en Brevibacterium liquefaciens (49) se ha podido determinar su composición de aminoácidos y su estructura que parecer ser la de un dímero de 92400 D con un peso molecular estimado por subunidad de 46 000 D mediante electroforesis en presencia de SDS al 0.1 % . El dímero es altamente asimétrico presentando un valor de f/f_0 de 1.6, lo cual puede explicar que en cromatografía de penetrabilidad el peso molecular aparente sea de 175 000 D.

En lo referente al componente catalítico, los datos de que se dispone en eucariontes son pocos, ya que, al contrario de los que ocurre en la enzima de bacterias, la proteína se encuentra integrada fuertemente en la membrana y es necesario su solubilización previa con detergentes, lo que contribuye a su inestabilidad y mayor dificultad de purificación. Como ha sido señalado por Ross y Gilman (52), la preparación del componente catalítico mejor caracterizada ha sido la obtenida a partir de un extracto de Lubrol 12A9 de membranas de células cyc⁻S49. Según estos autores el peso molecular de la misma es de 1.9×10^5 D. Una técnica más moderna denominada análisis por radiodesactivación puesta a punto por Kempner y Schlegel (53) ha dado como resultado un peso molecular de 1.5×10^5 D para la enzima de hígado (54). Las propiedades de las enzimas caracterizadas hasta ahora se reúnen en (52).

En cuanto a la composición de subunidades se conoce muy poco. Los datos más interesantes al respecto han sido aportados por Stellwagen y Baker (55), los cuales tras purificación de la

enzima de cerebro de bovino por cromatografía de afinidad y DEAE-celulosa otorgan a la misma un peso molecular de 1.14×10^5 D. La electroforesis en SDS permite asignar a la enzima una estructura a base de ocho subunidades de 16 000 D.

Un caso excepcional lo constituye la adenilato ciclasa de testículo de rata, descrita por primera vez por Braun y Dods (35), la cual es la única enzima soluble de eucariontes que se conoce y a la que Neer (56) asigna un peso molecular de 56 000 D, semejante al de la subunidad de Brevibacterium liquefaciens. En la misma zona de peso molecular se encuentra una de las enzimas solubilizadas de médula renal de rata cuyo peso molecular es de 38 000 D, aunque, no puede descartarse un origen proteolítico a partir de la otra especie presente en el tejido, de peso molecular superior (56).

Hoy se admite que el componente catalítico aislado es dependiente de Mn^{2+} (52, 56) en lugar de Mg^{2+} , requerimiento que se manifiesta de forma absoluta en la enzima soluble de testículo de rata (35). Ahora bien, los requerimientos varían cuando la enzima se encuentra integrada en la membrana.

La actividad de adenilato ciclasa es sensible a distintas proteasas y a reactivos que bloquean los grupos sulfhidrilo (58), lo que supone que algún residuo de cisteína es importante para la actividad catalítica. Algún otro residuo de cisteína debe ser fundamental para el acoplamiento con el componente regulador, ya que la N-etilmaleimida elimina la posibilidad de reconstitución a una concentración diez veces inferior a la que inhibe la catálisis.

Por último, hay que destacar la posibilidad de encontrar otra actividad de adenilato ciclasa dependiente de Mn^{2+} , descubierta por Mittal y Murad (60), los cuales observaron que la guanilato ciclasa bajo determinadas condiciones podía utili-

zar el ATP como un sustrato alternativo para formar cAMP.

1.2.3. REGULACION POR CATIONES DIVALENTES

Numerosos estudios han demostrado que tanto el Mg^{2+} como el Mn^{2+} desempeñan un papel esencial en la formación del cAMP. Todos los autores están de acuerdo en que el Mg^{2+} y el ATP forman un complejo $Mg-ATP^{2-}$ que constituye el sustrato. La mayor actividad en presencia de concentraciones de catión muy superiores a las que cabría esperar para la formación de los complejos con el ATP ha dado origen a múltiples interpretaciones.

Algunos autores (51, 61, 62, 64) postulan que los cationes divalentes activan la enzima a través de un sitio alostérico específico para los mismos en tanto que otros (65-69) atribuyen al Mg^{2+} la desinhibición de la enzima por formación de un complejo con el agente inhibidor $ATPH^{3-}$; sostienen estos últimos que tanto la actividad basal como la actividad estimulada por hormonas o GppNHp podían alcanzar sus niveles máximos evitando la localización del ATP protonado en el centro catalítico. También se había demostrado que la activación por GppNHp era especialmente susceptible a la inhibición por $ATPH^{3-}$, el cual retardaría la transición hacia el estado de máxima actividad promovida por el GppNHp que, sin embargo, se vería favorecida con la eliminación del $ATPH^{3-}$ en presencia de Mg^{2+} (70, 71).

Planteada la cuestión de la existencia de un centro de unión del metal, distinto del centro catalítico, son muchos los trabajos que ultimamente han pretendido esclarecer este problema. Un hecho establecido es que Mn^{2+} y Mg^{2+} no exhiben la misma potencia a la hora de activar la enzima, siendo el Mn^{2+} por lo general, el activador más potente. Sin embargo, las constantes de estabilidad de los complejos que pueden originar con el ATP o sus formas protonadas son muy similares y en ningún caso parece

que pudieran dar cuenta de la diferencia de potencia observada. Estas y otras observaciones tienden a soportar la hipótesis de la existencia de un sitio alostérico para los metales (72-74). Ahora bien, la localización de este "sitio metálico" sigue siendo una incógnita aunque son muchos los trabajos llevados a cabo a tal efecto (75, 76); en este sentido prevalece la idea de su localización en el componente regulador para GTP (72, 77, 78).

El papel del Ca^{2+} en la actividad de la enzima será considerado de forma independiente más adelante por sus implicaciones como agente regulador.

Como conclusión se puede actualmente afirmar que aparte de su participación en la formación del sustrato y la posible intervención en la eliminación del inhibidor nucleotídico (ATPH^{3-}), tanto el Mg^{2+} como el Mn^{2+} y posiblemente, aunque en menor medida, el Co^{2+} , ocupan un lugar destacado entre los efectores alostéricos de la enzima.

1.2.4. REGULACION POR CALCIO

La adenilato ciclasa de una gran variedad de tejidos se inhibe fuertemente por bajas concentraciones de calcio (79-81). En general, esta inhibición por calcio es más evidente en la enzima activada por Mg^{2+} que en la enzima activada por Mn^{2+} (74, 80) y procede de una forma no competitiva, independiente del estimulante empleado y de la concentración de ATP y cationes usados en los ensayos (74). Aunque sin confirmación, se especula que el mecanismo de inhibición por calcio en estos tejidos, afecta directa o indirectamente al postulado sitio alostérico de unión para los metales (74).

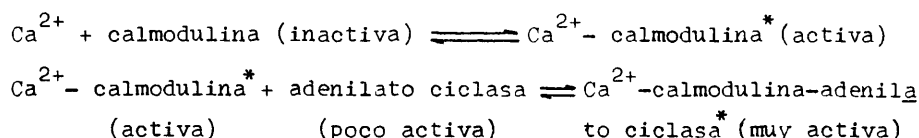
A pesar de esto, existían serias dudas de que el comportamiento del Ca^{2+} fuera siempre idéntico, ya que, Bradham y col (83) habían encontrado que el EGTA, a bajas concentraciones,

podía ejercer un fuerte efecto inhibitor sobre la adenilato ciclase, que era revertido por adición de Ca^{2+} (88); de lo que se deduce que el Ca^{2+} a bajas concentraciones debería ser un elemento esencial para la expresión de la actividad. Si bien, que daban algunas objeciones al respecto, ya que, la reversión de la inhibición por EGTA la podían ejercer tanto el Ca^{2+} como el Mn^{2+} . La aparente contradicción entre unos y otros resultados parece hoy en día resuelta, ya que este efecto activador del Ca^{2+} ha sido posible demostrarlo de forma directa, pero parece limitado a un número específico de tejidos y células como son el tejido cerebral (83-86), la línea celular de glioma (C-6) (87) y las células de neuroblastoma humano (91). En estos casos se observa siempre un efecto bifásico de respuesta al Ca^{2+} , activación a bajas concentraciones e inhibición altas concentraciones.

Al esclarecimiento de como se lleva a cabo el proceso activador a bajas concentraciones de Ca^{2+} han contribuido de forma notable los trabajos de Brøstrom y col (85) y los de Cheung y col (90) estableciendo que la activación estaba mediada por una calmodulina (proteína CDR, proteína reguladora dependiente de Ca^{2+}). Posteriormente esta adenilato ciclase dependiente de calmodulina ha sido observada en todas las regiones del cerebro (91).

Los primeros estudios realizados en preparaciones de enzimas dispersadas por detergentes habían mostrado que la acción de la calmodulina dependía de la presencia de concentraciones micromolares de Ca^{2+} . La acción conjunta del Ca^{2+} y la calmodulina transformaba la enzima en una forma más resistente a la inactivación térmica (92). Esto sugería que el mecanismo de activación de la adenilato ciclase por Ca^{2+} y calmodulina era similar al de la activación de la fosfodiesterasa y al mismo tiempo venía a confirmar la hipótesis de que ambas calmoduli

nas eran idénticas.



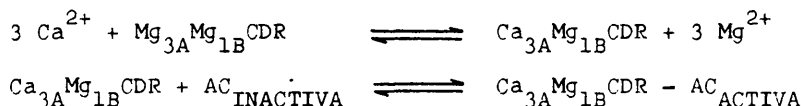
En recientes estudios se ha observado que las preparaciones particuladas de adenilato ciclase, libres de calmodulina endógena por sucesivos lavados con agentes quelantes, muestran un requerimiento de Ca^{2+} y calmodulina similar al de las preparaciones solubles (87, 93, 94), si bien, parecen mostrar una mayor complejidad de interacción entre Ca^{2+} , Mg^{2+} y calmodulina.

Brostrom y col (93) han sugerido que la actividad basal de adenilato ciclase independiente de calmodulina representa un componente diferente, más que una actividad basal de adenilato ciclase dependiente de calmodulina, ya que la incubación de una preparación particulada de cortex de cerebro de rata a 37°C durante una hora en presencia de calcio y calmodulina conduce a una desactivación preferencial de la actividad independiente de calmodulina. Mientras que, la enzima sin tratar se activa de 4 a 6 veces por Ca^{2+} y calmodulina, la enzima tratada se activa de 10 a 30 veces (94).

En la misma medida que la fosfodiesterasa, la adenilato ciclase dependiente de calmodulina, necesita la presencia de Ca^{2+} y de Mg^{2+} para manifestar su actividad; el Ca^{2+} para unirse a la calmodulina y el Mg^{2+} para la actividad catalítica. Como se ha observado que el Ca^{2+} y el Mg^{2+} presentan un comportamiento bifásico activación-inhibición, se ha intentado explicar el efecto, en base a la competencia del Mg^{2+} y del Ca^{2+} por los sitios respectivos de unión a la calmodulina. A este respecto, se cree que la calmodulina posee cuatro sitios de unión para el

Ca^{2+} (95, 96), tres de los cuales serían sitios de alta afinidad (clase A) y el otros de baja afinidad (clase B). La activación e inhibición provocada por el Ca^{2+} sería debida a la ocupación de los sitios de alta afinidad y de baja afinidad respectivamente, mientras que la inhibición por Mg^{2+} se debería a la ocupación por éste de los sitios de alta afinidad.

A baja concentración de calcio:



A alta concentración de calcio:



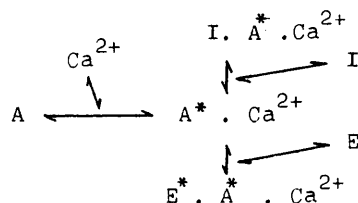
Quedan, sin embargo, por decidir si los sitios se distribuyen 3A1B, 2A2B, 1A3B, 4A o incluso si sólo había 2A o 2B (95).

A todo esto se puede añadir que el efecto inhibitor de altas concentraciones de Ca^{2+} y Mg^{2+} se observa en sistemas no regulables por calmodulina y que por lo tanto es más probable que sean los mismos mecanismos los que regulen el comportamiento de la enzima en ambos sistemas, tal vez a través del postulado sitio metálico de la enzima.

En otro aspecto, hemos de recordar que la activación por NaF, epinefrina, dopamina, GTP y toxina colérica de la adenilato ciclasa dependiente de calmodulina, es total o parcialmente dependiente de la presencia de Ca^{2+} y calmodulina (95, 96) si bien, otros investigadores piensan que los efectos son independientes, ya que son aditivos (91). Esto puede ser muy difícil

si se admite la posibilidad de que existan dos tipos de adenilato ciclasa en la misma preparación, uno dependiente y otro independiente de Ca^{2+} y calmodulina.

Por último, Cheung y col (91) añaden una nueva complicación al sistema al detectar la presencia de una proteína inhibidora de adenilato ciclasa y de fosfodiesterasa en cerebro, de peso molecular 80 000 D y que parece similar al inhibidor de fosfodiesterasa descrito por Wang y Desai (97, 98). Todavía no se conoce cual puede ser la función de esta proteína y si posee o no actividad enzimática, pero parece que el mecanismo de inhibición está relacionado con la activación por calmodulinas como se muestra en el siguiente esquema:



A: Proteína activadora (calmodulina)

I: Proteína inhibidora

E: Enzima (AC ó PDE)

1.2.5. REGULACION POR F^-

En las primeras investigaciones con los nucleótidos cíclicos se encontró que el NaF se comportaba como un activador de la biosíntesis del cAMP por la adenilato ciclasa (2,4). Posteriormente se ha visto que en todas las fuentes estudiadas, con algunas excepciones, el fluoruro se comporta como un activador. Entre las bacterias que no responden al fluoruro se encuentran el Brevibacterium liquefaciens (99) y la Tetrahymena pyriformis (100)

aunque sí lo hace el Streptococcus salivarius (47). La Neurospora crassa responde al glucagón pero no responde al fluoruro (102). Tampoco responde al fluoruro la adenilato ciclasa soluble de testículo de rata (35) y la enzima de esperma de toro (122)

También se vio desde un principio que el fluoruro no causa acumulación de cAMP en preparaciones de células intactas y por ello se supone que es incapaz de activar la adenilato ciclasa "in vivo " (103), contando con su capacidad de entrada en las células intactas (107). Por lo tanto, parece razonable considerar que el proceso de fragmentación de las membranas altera el sistema enzimático haciéndolo susceptible a la activación por NaF. El mecanismo de acción permanece aún desconocido, aunque son muchas las características examinadas en relación a su interacción con la enzima.

Puesto que la actividad ATPásica se reduce significativamente por NaF 5-10 mM, se pensó que el mecanismo de activación implicaba un proceso de conservación del sustrato. Pero tal suposición no es suficiente, pues, incluso, las velocidades iniciales determinadas con altas concentraciones de ATP se ven incrementadas y también se observa la activación en presencia de sistemas regeneradores de ATP, así como en preparaciones parcialmente purificadas de adenilato ciclasa solubilizada por detergentes, prácticamente libres de ATPasa (104).

La magnitud del efecto del NaF, varía marcadamente según la procedencia de la enzima (51). Las concentraciones de máxima actividad oscilan habitualmente entre 3 y 15 mM. Sin embargo, la concentración óptima de NaF puede verse influenciada por la concentración del Mg^{2+} presente en el ensayo. Así Birnbaumer y col (61), han demostrado que en preparaciones de membranas de adipocitos se puede revertir la pérdida de actividad a altas concentraciones de fluoruro, incrementando la concentración de Mg^{2+} .

Ahora bien, es muy probable que intervengan aquí fenómenos de complejación difíciles de controlar, ya que, la existencia de compuestos como MgF_2 (constante de estabilidad $10^{8.2}$) (105, 116) y MgF_2PO_4 (106, 116) debe ser tomada en cuenta.

En vista a determinar la asociación de la activación por F^- con algún componente intrínseco del sistema se ha procedido en muchos casos a la solubilización de la enzima con posterior determinación del efecto del F^- . Los resultados han sido, en general inciertos, ya que la presencia del detergente puede en parte, eliminar los efectos del anión. Así Johnson y Sutherland (89) encontraron que la adenilato ciclasa solubilizada de cerebro de rata, se inhibía ligeramente por F^- , pero cuando se eliminaba el detergente, la enzima agregada, sedimentaba y volvía a ser activable por el anión. En otros trabajos, la enzima solubilizada de cortex de cerebro de rata no respondió al F^- , si bien, un tratamiento de la fracción particulada con F^- , previo a la extracción con detergente, rindió una enzima soluble que se estimulaba por F^- (123). Los efectos del F^- en la solubilización de la enzima serán discutidos con mayor detalle más adelante.

La activación de la enzima por NaF en algunos casos no es posible revertirla por lavado o diálisis prolongada de las membranas, pero para ello se hace necesaria la copresencia en la preincubación del catión Mg^{2+} (51, 108). Esto ha motivado que el grupo de Najjar (109) haya sugerido la posibilidad de que la regulación por fluoruro se haga en base a un proceso de fosforilación-desfosforilación por analogía con el fenómeno encontrado en la fosfoglucomutasa, la cual es desfosforilada en presencia de fluoruro originándose un complejo fluorofosfato, lo que provoca una activación permanente de la enzima. Esto lo han reflejado en el siguiente esquema.

ADENILATO CICLASA FOSFORILADA (INACTIVA)	F^{-} , hormonas, fosfoproteína fosfatasa ATP, Proteína quinasas	ADENILATO CICLASA DESFOSFORILADA (ACTIVA)
--	--	---

Aunque existen algunas evidencias que pueden soportar este mecanismo, no son muchos los investigadores que apoyan el modelo.

Rodbell y col. (61,110) han sugerido que el mecanismo de estimulación del F^{-} en membranas de adipocitos puede ser explicado en base a una reducción de la K_{dis} aparente para el Mg^{2+} , en un hipotético segundo sitio de la enzima. El corolario de esta hipótesis es que el Mg^{2+} a altas concentraciones puede sustituir al F^{-} , y producir una enzima plenamente activa. Todo esto ha sido en parte debatido en base a que el Mg^{2+} en muchos tejidos no puede sustituir aún a altas concentraciones al efecto estimulador del F^{-} . Por otra parte, parece que el F^{-} no afecta ni a la K_m para el ATP (111) ni tampoco incrementa la afinidad de la enzima por el Mg^{2+} (62), sino que lo que hace es, sencillamente, incrementar la $V_{máx}$ de la reacción. Sin embargo, parece evidente que el F^{-} y el Mg^{2+} deben interaccionar de alguna manera durante el proceso de activación, ya que, la activación por F^{-} depende claramente de la presencia de Mg^{2+} como ha sido señalado con anterioridad y además, en algunos casos (51), puede efectivamente demostrarse, junto con un incremento de la V_{max} una disminución de la K_{dis} del Mg^{2+} . Dentro de esta línea no faltan autores como Rosen y col (113) que afirman que la activación afecta a la K_m pero no a la V_{max} . Para completar esta visión, Haën (65) propone que la activación por fluoruro y hormonas se debe a un decrecimiento en la sensibilidad de la enzima a la inhibición por ATP no complejoado con Mg^{2+} y además no cree que los efectos se puedan deber a la presencia de un segundo sitio de unión para el metal.

La adenilato ciclasa en muchos tejidos no responde a hormonas en presencia de concentraciones máximas efectivas de NaF. Como la enzima usualmente alcanza una mayor activación por NaF que por hormonas, se ha pensado que el fluoruro causa una expresión completa de la actividad enzimática, aunque, por supuesto, existen algunas excepciones a esta regla (114, 116). En preparados de membranas de adipocitos (115) se ha comprobado que la estimulación por fluoruro es claramente dependiente de la temperatura y que no empieza a ser efectiva hasta los 30°C, lo cual explica que en ciertas circunstancias no se alcance una actividad superior, en presencia de F⁻, que en presencia de hormonas. Al mismo tiempo, se ha observado que el F⁻ abole la activación por hormonas, por un mecanismo independiente de la concentración de la hormona, del ATP y del Mg²⁺, mientras que, la dependencia de la concentración del ion F⁻ para la inhibición es equivalente a la de activación. Como en este caso el ensayo se realiza de tal forma que la máxima actividad se consigue con hormonas y no con F⁻, no se puede argüir que la enzima se encuentra en un estado de máxima activación en presencia de F⁻, para explicar la falta de acción de las hormonas en presencia del mismo. Como tampoco afecta esta inhibición a la capacidad de unión de la hormona al receptor, parece más acertado pensar que el fluoruro intervenga en alguno de los pasos de acoplamiento entre el receptor y la región catalítica.

Hasta aquí lo que parece evidente es que el F⁻ ha de actuar en un sitio distinto al receptor hormonal, que podría ser el nexo de unión entre el receptor y el componente catalítico. En su apoyo, son muy significativos los experimentos realizados con membranas preparadas a partir de células previamente tripsinizadas en las que se observa una pérdida de respuesta hormonal sin que se vea afectada la respuesta al F⁻ (117). El tratamien-

to con detergentes o fosfolipasas de preparaciones de membranas de adipocitos (113) conduce también a una pérdida selectiva de la activación hormonal, sin pérdida de activación por F^- .

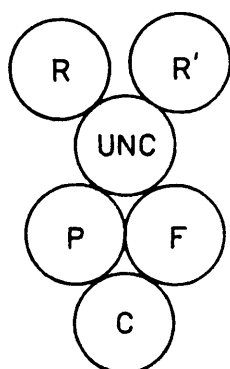
Son muchos los intentos que se han hecho para tratar de identificar el sitio de acción del fluoruro. Así, un intento lo constituye la observación de Bradham (118) de la necesidad de un factor proteico extraíble por detergentes para la completa expresión de la activación con F^- .

Cuatrecasas y col (119, 120) han desarrollado una técnica que implica la preparación de adenilato ciclasa particulada de cerebro de rata, que es GppNHp-insensible o NaF-insensible, por extracción diferencial de las membranas con detergentes. La enzima recupera las respuestas características a GppNHp y NaF después de la adición de los extractos solubles de membranas de varios tejidos. Las proteínas responsables de la reconstitución pueden separarse por cromatografía de penetrabilidad. La inactivación por tripsina o térmica de las actividades reconstituidas sugieren que las dos actividades son funcionalmente separables y residen en proteínas diferentes, siendo también distintas del componente catalítico y de la proteína reguladora dependiente de Ca^{2+} (calmodulina).

Eckstein y col (121), sin embargo, piensan que el efecto del F^- está mediado por la misma proteína reguladora que une GTP, ya que han encontrado que la inhibición de la actividad de la adenilato ciclasa por GDP β S también inhibe la estimulación por F^- , siendo revertida sólo cuando se elimina el nucleótido. De aquí concluyen que el F^- activa la adenilato ciclasa por interacción con el componente que une el nucleótido de guanina y que esta activación no requiere la unión del nucleótido, ya que puede tener lugar estando este sitio vacante.

Gilman y col (31) han intentado resolver el problema

de la composición estructural de la adenilato ciclasa con líneas celulares deficientes en adenilato ciclasa o algunas otras propiedades moduladoras de la misma. En base a sus resultados han postulado un modelo que queda reflejado en el esquema siguiente:



R, R' = Receptores
 UNC = Factor acoplante
 C = Unidad catalítica
 F = Unidad para la actividad basal, estimulada por GppNHp y por F^-
 P = Unidad para la estimulación por GppNHp

Lo más significativo es que postulan la necesidad de dos unidades para la activación por GppNHp, una de las cuales sería también necesaria para la estimulación por fluoruro y la propia actividad basal.

Los estudios más recientes (52) han modificado sustancialmente este modelo en los siguientes aspectos:

a) Los componentes P y F han pasado a denominarse componente G/F. Cassel y Pfeuffer (124) y Nielsen y col (125) han demostrado que la actividad GTP-dependiente y NaF-dependiente cromatografían juntos y es posible reconstituir ambas actividades mediante una única proteína. Howlett y Gilman (78) han comprobado que tanto la unión de GppNHp como de NaF decrecen el coeficiente de sedimentación de la proteína G/F. De todas formas aún no se descarta la posibilidad de que G/F esté formado por varias subunidades (126, 127).

b) El componente UNC es idéntico al G/F. Sternwex y Gilman (128) han demostrado que una preparación parcialmente purificada de G/F puede reconstituir la actividad dependiente de hormonas en membranas deficientes en componente UNC. Por ello se postula que el defecto encontrado en la variante UNC de células de linfoma S49, responde a alguna modificación del componente G/F que impide el acoplamiento entre el receptor y el dominio catalítico (52).

1.2.6. ACTIVACION POR OTROS IONES

Drummond y Duncan (111) examinaron junto con el F^- una gran variedad de aniones y de compuestos organofluorados con objeto de identificar otros posibles activadores de la adenilato ciclasa. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla 1. Sólo el fluoruro y el bifluoruro son capaces de activar la enzima significativamente a bajas concentraciones. Es de resaltar también el efecto inhibitor marcado que ejerce el IO_3^- , así como la ausencia absoluta de estimulación por parte de los derivados organofluorados.

Cuando ya se daba por sentado que el F^- era el único anión capaz de activar la enzima, Schwabe y col (129) demostraron la activación de la adenilato ciclasa de membranas de adipocitos por vanadato. Este mismo efecto se ha confirmado en corazón de cobaya (130) y en corazón de rata, conejo, cobaya y gato (131).

El molibdato incrementa la actividad de la adenilato ciclasa en membranas de hígado de rata, al igual que en otros tejidos como cerebro, corazón, riñón y eritrocitos (132, sin embargo, como ocurre con el fluoruro y el GppNHp, el molibdato es incapaz de activar la enzima soluble de testículo de rata.

Parece ser que la estimulación por vanadato y molibda

TABLA 1: Ensayo de activación de adenilato ciclasa de músculo cardíaco (112)
(Tris-acetato 40 mM, pH 7.5, ATP 0.28 mM, MgSO_4 18 mM)

<u>COMPUESTO</u> (8 mM)	<u>(pmol cAMP/min/mg)</u>	<u>COMPUESTO</u> (8 mM)	<u>(pmol cAMP/min/mg)</u>
Nada	60.7	Nada	17.7
CN^-	82.0	F^-	272.0
SCN^-	47.0	$\text{BiF}^- (\text{NH}_4\text{F-HF})$	128.0
NO_3^-	56.0	Monofluoroacetona	22.6
NO_2^-	56.3	2-Fluoroetanol	22.2
IO_3^-	8.3	o-Fluoroanilina	22.8
HPO_4^{2-}	29.6	Trifluoroetanol	24.1
I^-	59.5	DL-Monofluorotirosina	19.5
Br^-	76.2	Acido fluoropirúvico	18.5
Cl^-	76.5		
F^-	275.0		
$\text{BiF}^- (\text{NH}_4\text{F-HF})$	124.0		

to se realiza a través del mismo mecanismo que la activación por fluoruro y se sabe que no presenta efectos aditivos sobre la estimulación por GppNHp o F^- , lo que apoya la anterior hipótesis.

Es importante resaltar que los tres aniones ya conocidos como activadores de la adenilato ciclasa son al mismo tiempo inhibidores de fosfatasas, lo cual podría ser un argumento en pro de la regulación de la enzima mediante procesos de fosforilación-desfosforilación. Sin embargo, cabe apuntar que el componente regulador que une GTP tiene actividad GTPásica y si bien no es probable que estos aniones activen la adenilato ciclasa (actuando como inhibidores de esta actividad GTPásica por un mecanismo similar al de la toxina colérica, ya que de ser así su acción tendría que ser dependiente de GTP) sí es probable que el componente regulador posea un sitio de reconocimiento para estos aniones como otras fosfatasas lo tienen y que un cambio conformacional provocado por la interacción, pueda suministrar una disposición óptima para la activación del componente catalítico, aún en ausencia del GTP. Un mecanismo de este tipo estaría en línea con los mecanismos propuestos para la inhibición de las fosfatasas por vanadato (133).

Otra problemática que presentan estos aniones es la diversidad de formas bajo las cuales pueden existir y la dificultad de asignar la actividad a algunas de ellas.

Hay un hecho, sin embargo, que destaca al vanadato sobre el conjunto y es que exhibe singulares implicaciones fisiológicas (129, 131, 133). No sólo su deficiencia en la dieta retrasa el crecimiento en ratas o en cultivos celulares; lo que aboga en favor de su importancia metabólica, sino que puede ejercer múltiples efectos farmacológicos como, por ejemplo, los que afectan a la contracción cardíaca. Se calcula que la concentración normal en los tejidos es del orden de 0.1-0.7 nmol/g de pe

so húmedo (133), si bien, existen organismos como la Amanita muscaria o ciertas especies de tunicados como la Ascidia nigra, que acumulan elevadas concentraciones de vanadio, pudiendo llegar en los últimos al orden de 1 M, aunque la concentración en el agua marina sea del orden de 5×10^{-8} M. Las concentraciones antes apuntadas como fisiológicas, no están lejos de las concentraciones de actuación observadas "in vitro". Además el efecto del vanadato ha podido comprobarse tanto "in vivo" como "in vitro".

1.2.7. REGULACION POR GTP

En 1971 Rodbell y col (134, 135) encontraron que la estimulación hormonal de la adenilato ciclasa requería la presencia de GTP. A partir de este momento se comenzó a estudiar el cómo y el porqué de este requerimiento y se llegó a la conclusión de que las antiguas teorías sobre la interacción directa de los receptores hormonales con la enzima no eran correctas sino que debería existir un nexo de unión a través de una proteína capaz de interaccionar con el GTP, la que en definitiva provocaría la estimulación. Fue fácil comprobar que la estimulación no se realizaba mediante procesos de fosforilación, ya que los análogos no hidrolizables del GTP, tales como GppNHp o GppCH₂p, podían ejercer la misma función, y además la estimulación cesaba a medida que se producía la hidrólisis del GTP. Se vislumbraba así un esquema de regulación en el que el GTP ocuparía un papel central. A partir de entonces son muchos los modelos que han sido propuestos para dar una interpretación global de todos los hallazgos realizados. Vamos a revisar aquí uno de los modelos más recientes que han sido postulados sin que por ello perdamos la oportunidad de apuntar más adelante algunas de las modificaciones que para algunos casos concretos se proponen.

El modelo propuesto por Rodbell (57) recoge las carac-

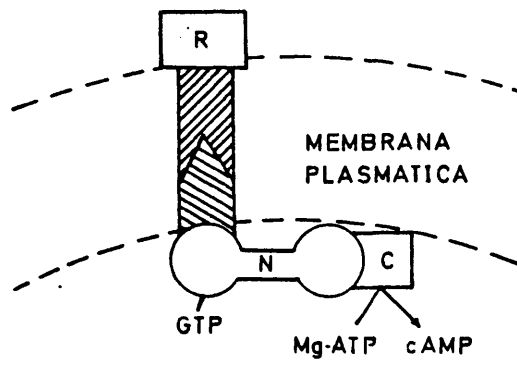


FIGURA 1. Representación esquemática de los componentes de la adenilato ciclasa.

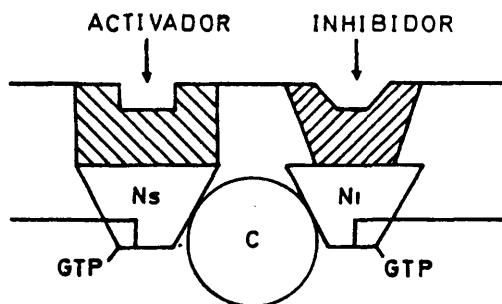
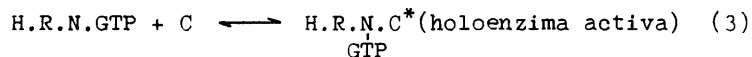
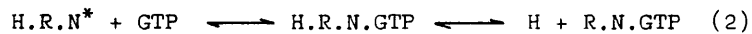


FIGURA 2. Regulación dual de la adenilato ciclasa

terísticas fundamentales de los componentes de la adenilato ciclase, (tabla 2) y presenta una disposición estructural para el componente RNC del tipo expuesto en la fig 1. Para explicar el proceso de activación de la adenilato ciclase se puede aceptar un modelo cinético del tipo:



Este modelo recoge la posibilidad de que la hormona transforme a N en un estado activado N* capaz de unir GTP. Una vez unido el GTP se tendrían dos posibilidades de continuación, una por la que se liberaría la hormona, lo cual explicaría la menor afinidad de la hormona por el receptor en presencia de GTP y otra preferencial por la que se uniría al componente catalítico C para dar la holoenzima activa. El equilibrio total vendría regulado por la concentración de C. Se calcula que para el sistema hepático, esta concentración puede ser del 10% de la R y N.

Los estudios de pesos moleculares por la técnica de análisis por radiodesactivación (54) y los hallazgos de Pfeuffer (126) sobre el peso molecular del componente regulador, han hecho posible la creación de un modelo de activación por agregación-desagregación (Fig 3). Aparte de acoplarse a un esquema secuencial de reacciones como el ya descrito, este modelo presenta la posibilidad de que la oligomérica estructura del complejo RN dé origen a interacciones homotrópicas, de tal forma que una ocupación mínima de los receptores por las hormonas cause una producción casi máxima de la señal funcional activa (monómeros RN-GTP) en la presencia de concentraciones saturantes de GTP.

Por lo que se refiere a los mecanismos de desactivación del sistema, no se ha dado todavía una explicación totalmente convincente para este proceso, si bien, la presencia de una actividad GTPásica aparentemente asociada al componente regulador N y el mecanismo de actuación de la toxina colérica, que más tarde se comentará, han conducido a postular un modelo de desactivación por hidrólisis del GTP y posterior expulsión del GDP de la subunidad reguladora. Cassel y col (136, 137) han propuesto el modelo que se recoge en la fig 5 para la activación-desactivación de la enzima. Según estos autores la hormona induciría la salida de GDP con la facilitación de la entrada del GTP, lo que en definitiva significaría que la hormona incrementaría la actividad GTPásica del sistema. Estos mismos autores han comprobado que la hidrólisis de cada molécula de GTP va acompañada de la síntesis de unas 20 moléculas de cAMP. Ahora bien, este modelo sencillo que puede explicar por qué todos aquellos efectos que dan como resultado un bloqueo de la actividad GTPásica conducen a un incremento de la biosíntesis del cAMP, no da cuenta del hecho comprobado de que el GDP puede estimular la enzima en presencia de glucagón (138) o ACTH (139). Ahora bien, frente a estos resultados se pueden argüir dos hechos, uno de ellos es que normalmente los ensayos se realizan en presencia de sistemas regeneradores de ATP, lo que podría convertir parte del GDP en GTP con la consiguiente activación y así se ha visto que en membranas de eritrocito de pavo el GDP β S (análogo no hidrolizable y no fosforilable del GDP) produce una completa inhibición de la adenilato ciclasa activada por hormona más GTP (122), aunque también es cierto que la inhibición en preparaciones de adenilato ciclasa de hígado y parotidas en presencia de este análogo no excede del 70-80 %. Esto podría estar de acuerdo con un segundo argumento, que se expondrá con detalle más adelante cuando tratemos de la regula

ción por adenosina, que propone que en algunos sistemas el GDP puede dar origen a un estado activo de la enzima, aunque por su puesto menos activo que en presencia de GTP.

TABLA 2: Propiedades de los componentes de la adenilato ciclasa (57).

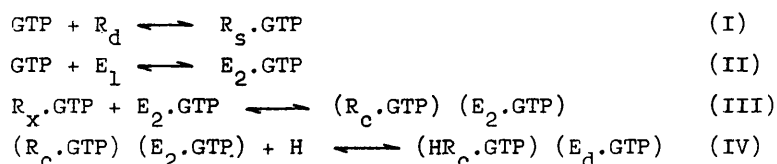
<u>COMPONENTES</u>	<u>PROPIEDADES</u>
C	Reacciona preferentemente con MnATP como sustrato
NC	Utiliza MgATP ó MnATP como sustrato cuando es activada por GppNHp, por toxina colérica y NAD^+ en presencia de GTP y por ion fluoruro.
R	Baja afinidad por los agonistas hormonales. No presenta efectos heterotrópicos de GTP.
RN ó (RN) ⁿ	El GTP reduce la afinidad de los agonistas hormonales por R. Las hormonas forman fuertes complejos de unión.
RNC	Es igual que NC, pero responde a hormonas y GppNHp; une GDP fuertemente en ausencia de hormonas. Las hormonas estimulan el intercambio de GDP por GTP en el sitio N.

Engarzando con la posibilidad de que pueden existir diferentes componentes reguladores que unan GTP, Rodbell (57) ha sugerido que se puede admitir la existencia de al menos dos tipos distintos de componentes reguladores que se denominarían N_s y N_I (Fig. 2), donde N_s sería una unidad reguladora con efecto estimulante y N_I una unidad reguladora con efecto inhibidor. Hay que señalar, sin embargo, que no todos los efectos inhibidores se pueden relacionar claramente con la participación de las unidades N_I y que la presencia de Na^+ como elemento importante en la regu

lación añade una nueva complejidad al mecanismo.

Cabe pensar, sin embargo, que la situación podía simplificarse a base de un solo tipo de unidad N, la cual, en dependencia del entorno originaría un estado E_{GDP} activo o no activo, lo cual como se explica en el apartado de la adenosina puede originar activación o inhibición del sistema según los casos. Otra posibilidad, en este mismo orden de ideas, sería pensar que es el efector el que determinaría cambios conformacionales diferentes en la unidad N, de tal forma que en algunas circunstancias se provoque un bloqueo de la enzima en estados E_{GDP} inactivos o poco activos, y por imposibilidad de liberar el GDP se produjese la inhibición del sistema. Toda esta especulación centra el problema en el aislamiento y estudio de las propiedades de las proteínas tipo N. Algunos investigadores han propuesto la existencia de otro sitio de unión para el GTP distinto de la unidad N que estaría asociado directamente al receptor R. Los primeros en evidenciar este hecho fue el grupo de Rodbell (141), al postular la presencia de dos sitios diferentes en base a que: (i) la concentración activa del GppNHp, para los efectos en la unión de la hormona es al menos un orden de magnitud más alta que la necesaria para la activación de la enzima; (ii) mientras que el GppNHp es más potente como activador de la enzima que el GTP, lo es menos, en el proceso de unión de la hormona (iii) el EGTA disminuye la potencia de activación enzimática del GppNHp, mientras que, no afecta a la potencia de acción en la unión de la hormona (iv) el pretratamiento de las membranas con GppNHp conduce a un estado activo de la adenilato ciclasa que no revierte por lavados o por adición de GTP, pero también conduce a un estado de baja afinidad por la hormona que sí es reversible por lavado; (v) el tratamiento de las membranas con fosfolipasa C elimina la acción del GppNHp en la unión del glucagón pero no altera la capacidad

del nucleotido para activar la enzima. Recordemos que, el efecto del GTP sobre la unión del glucagón a las membranas es negativo, en tanto que reduce la afinidad de la unión. A partir de estos hechos se propone un modelo mecanístico que hace posible la comprensión del sistema:



El receptor se encontraría en tres posibles estados; R_d , de alta afinidad por la hormona y baja afinidad por GTP; R_s , con características contrarias y R_c , de características intermedias. La enzima se podría encontrar también en dos estados E_1 inactivo de baja afinidad para el GTP y E_2 activo de alta afinidad por el nucleotido.

Este modelo que puede dar cuenta de algunos fenómenos observados, adolece de una explicación convincente para la activación de la enzima en presencia de hormonas.

Un modelo sin tantas pretensiones cinéticas ha sido propuesto por Strosberg y col (142) para explicar la actuación de los agonistas adrenérgicos, donde aparte de la presencia de dos sitios de unión para el GTP se exponen los posibles sitios de acción del ditiotreitol (DTT) y de la N-etilmaleimida (NEM) conocidos agentes desactivantes para los receptores β -adrenérgicos en eritrocito de pavo. Un esquema puede verse en la fig 4.

En esta línea se encuentran también los experimentos realizados por Iyengar y Birnbaumer (138) en membranas plasmáticas de hígado de rata, los cuales sugieren que la adenilato ciclasa estaría sujeta a dos niveles de regulación que pueden co-

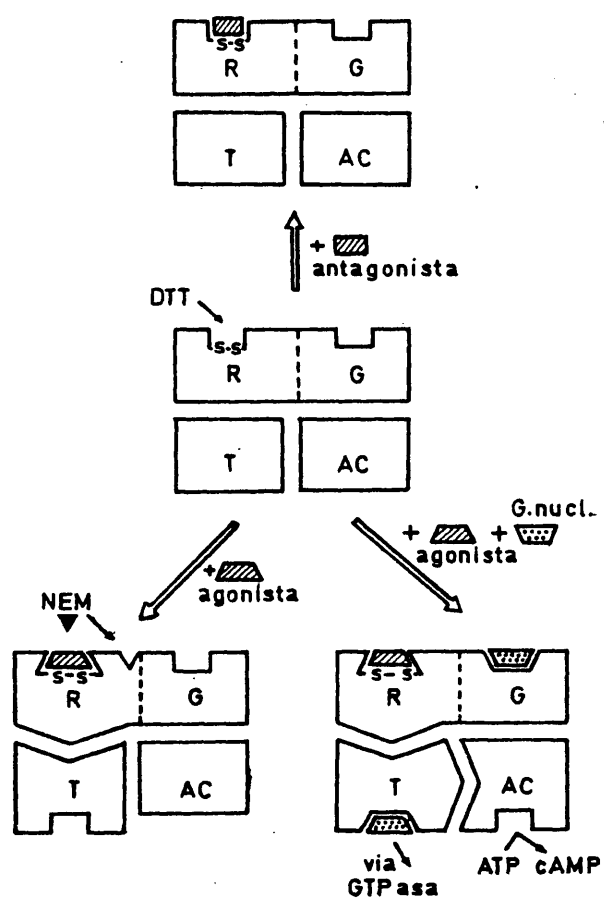


FIGURA 4. Modelo para la regulación del sistema β -adrenérgico

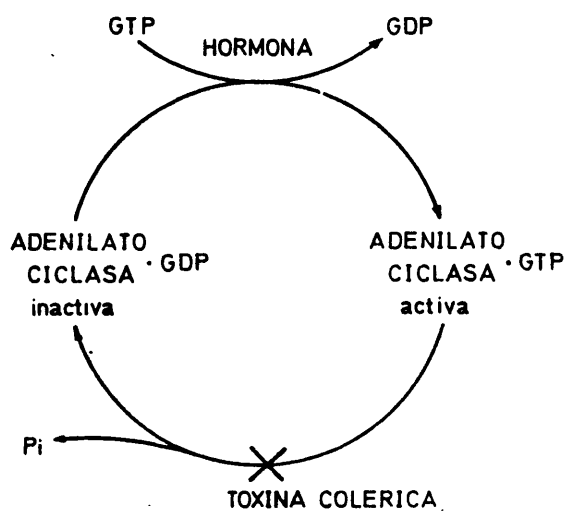


FIGURA 5. Regulación de la adenilato ciclasa por el ciclo de la GTPasa.

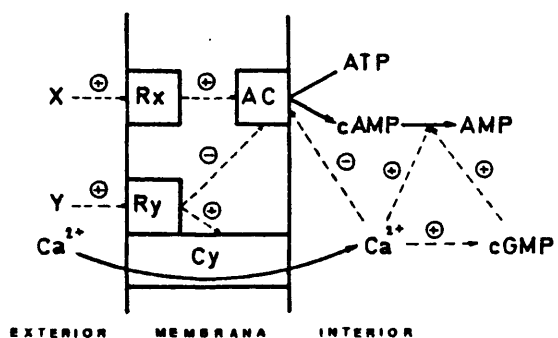


FIGURA 6. Control bidireccional que explica la inhibición de la biosíntesis del cAMP
(151)

existir y sinergizar o proceder con relativa independencia. Un nivel correspondería a lo que se puede denominar "regulación por receptor" y otro a la "regulación por GTPasa".

La regulación con participación de la hormona comportaría la actuación de un sitio nucleotídico asociado con el receptor (sitio R) y otro sitio nucleotídico asociado con el sistema de adenilato ciclasa (sitio G). El sitio nucleotídico R puede aceptar tanto GDP como GTP para promover la unión de la hormona y el acoplamiento del receptor al sistema, con su consiguiente activación. Lo que no parece ya tan claro es que se necesite también la ocupación del sitio G, ya que se ha visto que el GDP puede provocar la activación de la enzima por glucagón incluso en condiciones donde el sitio G debe de estar ocupado por GDP.

La regulación sin participación de hormona implicaría la participación de GTP y de la actividad GTPásica del sitio G. En estas condiciones la presencia de GDP resultaría inhibitoria para el sistema. También en ausencia de hormonas, la actividad GTPásica puede ser inhibida por factores ADP-ribosilantes, que provocan una permanente activación del sistema.

Quedan así apuntados algunos de los modelos que han surgido en los últimos años de las interpretaciones realizadas de los resultados experimentales, sin que hasta el momento sea posible proponer un modelo generalizable, entre otras cosas porque lo más probable es que el sistema no se comporte exactamente igual en las células de distinta procedencia.

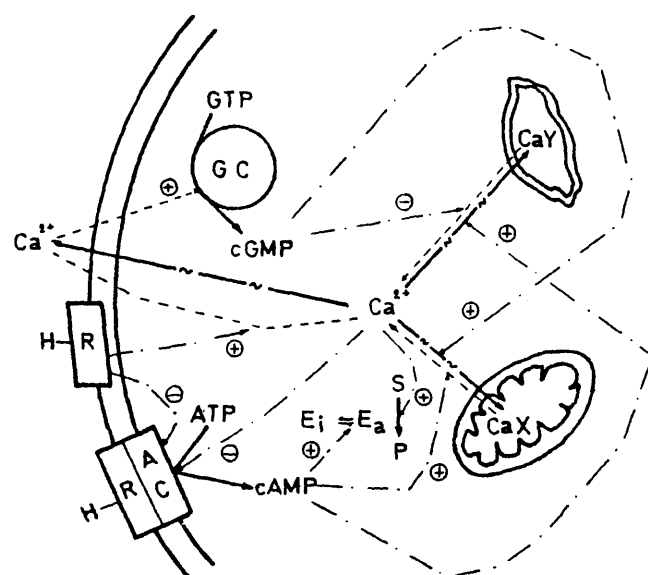
1.2.8. REGULACION POR HORMONAS, NEUROTRANSMISORES Y DROGAS

Esta faceta de la regulación de la enzima es sin duda la más sobresaliente y la que más esfuerzos ha motivado en torno a su mejor caracterización y comprensión. Algunas revisiones pueden verse en (51, 52, 57, 108, 142, 143, 145-149, 151, 157, 163).

Además, dado que algunas propiedades de la respuesta hormonal han sido tratadas ya en capítulos precedentes, nos limitaremos aquí a resaltar exclusivamente algunas de las características más importantes.

Los receptores son proteínas individuales distintas de la adenilato ciclasa. Esta idea deriva en buena medida de los estudios cinéticos de activación de la adenilato ciclasa, particularmente en membranas de adipocitos. En estas células, múltiples hormonas que se unen a diferentes receptores, parecen competir por un número constante de moléculas de adenilato ciclasa (143). Otro argumento en favor de esto, son las observaciones sobre su regulación ontogénica independiente (152, 153). Evidentemente los experimentos de manipulación química o genética, en los cuales la desactivación de la enzima no impide la unión de la hormona o viceversa, son los que aportan una evidencia más directa a favor de esta teoría (52, 154, 155). Pero sin lugar a dudas, los experimentos más espectaculares hasta ahora realizados son los de fusión celular para reconstituir el sistema de adenilato ciclasa (156). Por último, la separación y purificación del receptor como entidad independiente de la actividad enzimática es la confirmación definitiva de este aspecto. Las características moleculares del receptor β -adrenérgico y del receptor de gonadotropina se pueden ver en (52).

Todo esto se interpreta en términos de la hipótesis del receptor móvil (143). Según esta hipótesis, los receptores y la adenilato ciclasa son proteínas independientes, relativamente libres para difundir e interactuar en el plano de la bicapa lipídica. Cuando el receptor capta una molécula de una hormona específica adquiere nuevas propiedades que le confieren una especial afinidad por la adenilato ciclasa. La subsiguiente interacción del receptor unido a la hormona con la enzima provoca la activación de ésta y la producción de cAMP.



—~—~— Transporte activo
 - - - - - Transporte pasivo

FIGURA 7. Regulación por Ca^{2+} y nucleótidos cíclicos (188).

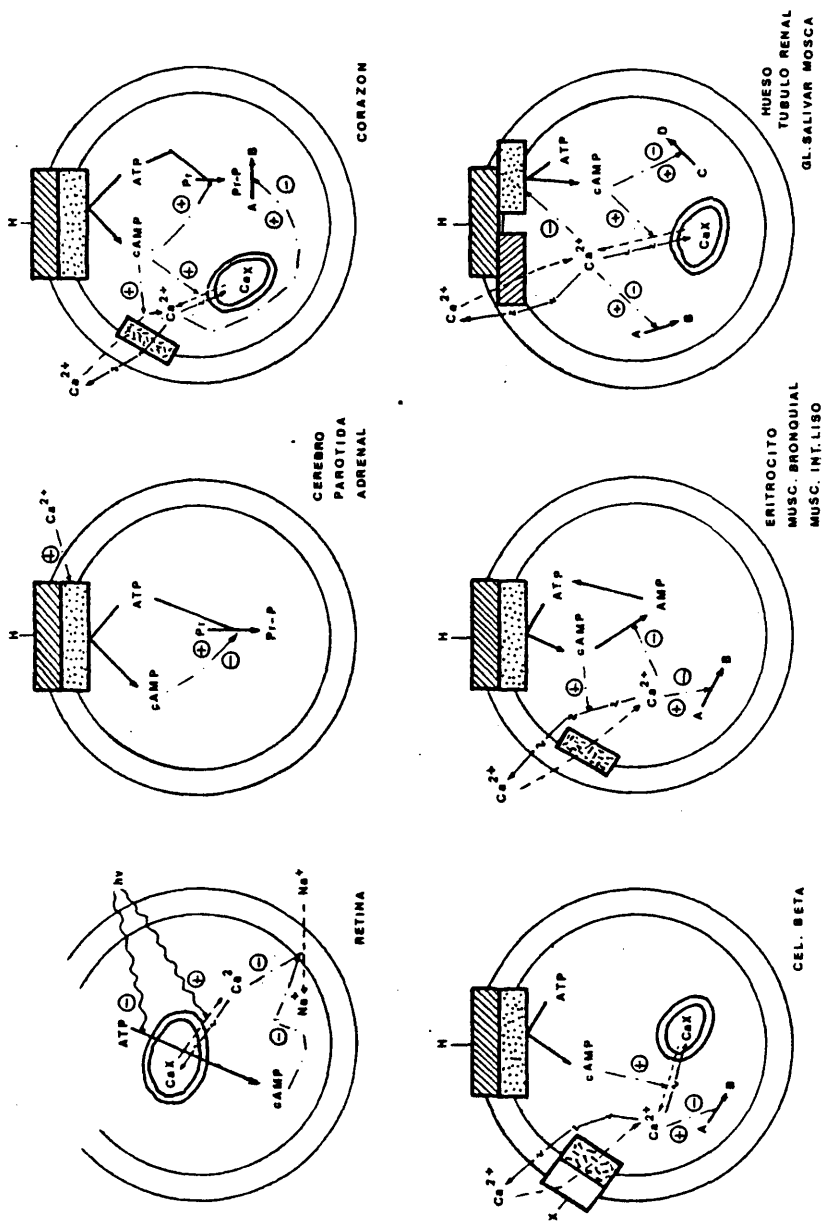


FIGURA 8. Interrelación entre el Ca^{2+} y el cAMP (188)

Como ya se vio anteriormente, para que la activación de la adenilato ciclasa tenga lugar es necesaria la presencia de otras estructuras que transmitan el efecto desde el receptor al componente catalítico. Aún no se conoce con exactitud la naturaleza de este proceso, pero sí se dispone de una serie de modelos que permiten hacerse una buena idea conceptual de la operación del sistema. Véanse figs. 1, 2, 3, 4, 5.

Uno de los procesos más estudiados en la regulación hormonal es el fenómeno de la tolerancia. Para abordar el problema, se han utilizado líneas celulares sometidas a un continuo tratamiento con agentes estimulantes de la actividad de adenilato ciclasa, fundamentalmente agonistas β -adrenérgicos (145-147). Existen dos tipos de tolerancia, una específica y otra inespecífica. Parece evidente que la tolerancia específica no debe estar mediada por el cAMP, ya que todos los agonistas que activan la adenilato ciclasa no deberían poseer especificidad; sin embargo, en la tolerancia inespecífica se piensa que está implicado el nucleótido que de alguna manera induciría la biosíntesis de algún factor proteico desensibilizante del sistema (147). La tolerancia específica probablemente se lleve a cabo por bloqueo de los receptores en un estado incapaz de activar la adenilato ciclasa (145).

Por último, en las tablas 3, 4, 5 se reúnen los neurotransmisores, hormonas y fármacos que pueden actuar sobre el sistema de la adenilato ciclasa a través de receptores específicos. Hay que señalar que en tanto que para los procesos que originan la activación del sistema se admite un mecanismo directo a través de algún componente de acoplamiento, para los procesos de inhibición el mecanismo puede ser mixto o totalmente indirecto figs. 2, 6, 7, 8.

TABLA 3: Hormonas que actúan vía adenilato ciclasa

<u>HORMONA</u>	<u>EFEECTO</u>	<u>REFERENCIAS</u>
GLUCAGON	ACTIVADOR	(57, 108, 160)
ACTH	"	(160, 174, 178)
LH	"	(180, 181)
FSH	"	(179)
TSH	"	(159, 166, 173)
OXITOCINA	"	(161, 170)
ADH	"	(161, 170)
PANCREOZIMINA	"	(169, 172, 176)
SECRETINA	"	(169, 172, 176)
PTH	"	(163, 182)
VIP	"	(183)
LH-RH	"	(184)
TRH	"	(184)
GH-RH	"	(184)
PRH	"	(184)
CRH	"	(184)
INSULINA	"	(168)
INSULINA	INHIBIDOR	(151)
GH-RIH	"	(168)
PR-IH	"	(168)
SOMATOMEDINAS	"	(190)
hCG	ACTIVADOR	(181, 189)

TABLA 4: Neurotransmisores que actúan vía adenilato ciclasa (57, 148, 149, 151, 186, 187)

<u>RECEPTOR</u>	<u>NEUROTRANSMISORES</u>	<u>EFFECTO</u>	<u>AGONISTAS</u>	<u>ANTAGONISTAS</u>
Dopaminérgico	Dopamina	Activador	Apomorfina -Bromocriptina ADTN	Antidepresivos tric. Neurólépticos tric. Espiropéridol -Flupentixol
Serotonérgico	Serotonina	Activador	5-Metoxi-N-N Dimetiltryptamina	BOL, LSD Metisergida Ciproheptadina
Histaminérgico-H ₂	Histamina	Activador	Betazola	Metamida Cimetidina
β-Adrenérgico	Norepinefrina	Activador	Epinefrina Isoproterenol HBI	Alprenolol Propanolol DHA, HYP, DCI
Octopaminérgico	Octopamina	Activador	Epinefrina Norepinefrina Tiramina	Fentolamina
Sustancia P	Sustancia P	Activador	---	---
Opiáceo	Encefalina	Inhibidor	Morfina	Naloxona
α ₂ -Adrenérgico	Norepinefrina	Inhibidor	Clonidina	Fentolamina
Muocarínico	Acetilcolina	Inhibidor	Metacolina	Atropina

TABLA 5: Sustancias que actúan sobre adenilato ciclasa no clasificables como hormonas o neurotransmisores.

<u>SUSTANCIA</u>	<u>EFEECTO</u>	<u>REFERENCIA</u>
ADENOSINA	ACTIVADOR-INHIBIDOR	Capítulo 1.2.9.
PROSTAGLANDINAS	ACTIVADOR-INHIBIDOR	Capítulo 1.2.11.
NORFINA	INHIBIDOR	(148)
TROMBINA	INHIBIDOR	(165)
HALOTANO	INHIBIDOR	(167)
CLOFIBRATO	INHIBIDOR	(177)
METADONA	INHIBIDOR	(171)
CON A	ACTIVADOR	(185)
PHA	ACTIVADOR	(185)
WGA	ACTIVADOR	(185)
IONOFORO A23187	ACTIVADOR	(185)

PHA. = Fitohemaglutinina

WGA = Aglutinina de germen de trigo

CON A = Concanavalina A

1.2.9. REGULACION POR ADENOSINA

Hoy en día se piensa que la adenosina puede jugar un papel tan importante como las hormonas en la regulación de la adenilato ciclasa. Sattin y Rall (191) fueron los primeros en describir un potente efecto estimulador de la adenosina sobre la adenilato ciclasa de cerebro de cobaya. Sin embargo, se ha comprobado posteriormente que puede comportarse como un potente inhibidor en otro tipo de células tales como los adipocitos. Tanto el efecto activador como inhibidor a bajas concentraciones de adenosina es antagonizado por metilxantinas. Este antagonismo frente a la adenosina

puede dar cuenta de una parte, al menos, de los efectos de las metilxantinas sobre los niveles de cAMP en muchos tejidos. En adición a estos efectos directos sobre la adenilato ciclasa, la adenosina a altas concentraciones (del orden de milimolar) puede ejercer múltiples efectos sobre el metabolismo celular como resultado de su propio metabolismo intracelular y especialmente en lo que concierne a su conversión en nucleótidos.

Londos y Wolff (192) intentando unificar todas las teorías sobre la actuación de la adenosina en un único modelo, fueron los primeros en postular la existencia de dos sitios diferentes a través de los cuales se mediarían los distintos efectos de la adenosina sobre la adenilato ciclasa. Según este modelo, los efectos de concentraciones nanomolares de adenosina sobre la enzima, vendrán mediados a través de un sitio, "R", con una estricta especificidad estructural para el anillo de ribosa y presumiblemente situado en la superficie extracelular de la membrana plasmática. Todos los efectos de la adenosina mediados vía sitio "R", serían competitivamente antagonizados por metilxantinas. Los efectos de concentraciones micromolares de adenosina se suponen mediados vía sitio "P". Este sitio "P" pudiera estar localizado en la superficie intracelular de la membrana y los efectos de la adenosina serían debidos a su conversión en 5'-AMP o quizás otros nucleótidos. Los efectos inhibidores de la adenilato ciclasa, por altas concentraciones de adenosina se han demostrado asimismo en preparaciones de células rotas y no son afectados por las metilxantinas.

Las diferencias entre los sitios "R" y "P" se resumen en la tabla 6. En la tabla 7 se reseñan algunos de los compuestos análogos de adenosina que activan e inhiben la adenilato ciclasa vía sitio "R" y sitio "P", respectivamente.

La distribución de los efectos a través de los sitios

TABLA 6: Diferencias entre el sitio "R" y el sitio "P" (164)

	<u>SITIO "R" O</u> <u>DE ADENOSINA</u>	<u>SITIO "P" O</u> <u>DE AMP</u>
Requiere que el anillo de ribosa se encuentre intacto, aunque acepta sustituciones en el anillo de purina, tal como N ⁶ -fenilisopropiladenosina	SI	NO
Requiere que el anillo de purina se encuentre intacto, aunque acepta modificaciones en el anillo de ribosa como 2',5'-dideoxiadenosina	NO	SI
Son antagonizados por compuestos que bloquean la captura celular de adenosina	NO	SI
Son antagonizados por teofilina	SI	NO
Se pueden demostrar en preparaciones solubles con actividad de adenilato ciclasa	NO	SI
Siempre inhiben la adenilato ciclasa	NO	SI
Requieren altas concentraciones de adenosina	NO	SI

"P" y "R" presenta una complejidad adicional, ya que si bien todas las acciones sobre el sitio "P" dan como resultado una inhibición de la adenilato ciclasa, las acciones mediadas vía sitio "R" pueden implicar tanto una activación como una inhibición de la enzima, en dependencia del tejido o de la célula de que se trate (tabla 8). El verdadero sitio "R", o de adenosina, resulta difícil evidenciar en preparaciones libres de células, mientras que la inhibición de la adenilato ciclasa vía sitio "P", o de AMP, es fácilmente observable en estos sistemas. Más aún, la inhibición

TABLA 7: Efecto de los análogos de adenosina en la adenilato ciclase (164)

<u>ESTIMULACION VIA SITIO "R"</u>	<u>INHIBICION VIA SITIO "P"</u>
2-Aminoadenosina	2'-O-metiladenosina
2-Azidoadenosina	2'-Desoxiadenosina
2-Metiladenosina	3'-Desoxiadenosina
N ⁶ -Metiladenosina	5'-Desoxiadenosina
N ⁶ -Dimetiladenosina	2',5'-Didesoxiadenosina
N ⁶ -Ciclohexiladenosina	2',3'-Isopropiliden-adenosina
N ⁶ -Feniladenosina	9-β-D-Arabinofuranosiladenosina
N ⁶ -Fenilisopropiladenosina	9-β-D-Silofuranosiladenosina
	2'-Desoxiadenosina-3-monofosfato
	5'-Amino-5'-desoxiadenosina

via sitio "R" sólo puede ponerse de manifiesto en condiciones especiales, como son la presencia de GTP y el tratamiento previo de las membranas con adenosina desaminasa (193). Todo este esquema de actuación se ve ligeramente complicado en los adipocitos (una de las pocas células donde se han comprobado efectos inhibidores via sitio "R"), ya que, parece ser que la inhibición via sitio "R" de la lipólisis puede ser mediada por otra ruta distinta de la inhibición de la adenilato ciclase, a la que Fain y Malbon (164) denominan "X" (Fig. 9).

Para unificar todos los criterios hasta aquí esbozados Fain y Malbon (164) proponen un modelo unitario que interpreta los efectos activador e inhibidor via sitio "R". Se postula que la adenilato ciclase existe en tres estados de actividad interconvertibles: (i) un estado inactivo (E_0); (ii) un estado de alta actividad unido al GTP (E_{GTP}); y (iii) un estado unido al GDP

TABLA 8: Tejidos en los cuales la adenosina actúa vía sitio "R"
a bajas concentraciones (164)

<u>TEJIDO</u>	<u>EFEECTO SOBRE</u> <u>ADENILATO CICLASA</u>
Cortes de cerebro (cobaya, rata)	ACTIVACION
Cortes de pulmón (rata)	"
Plaquetas (humanas)	"
Cultivos celulares de neuroblastoma (humanos)	"
Linfocitos (humanos)	"
Miocardio ventricular (cobaya)	"
Cortes de piel (cerdo)	"
Cultivo de células adrenales (Y-1) (ratón)	"
Cultivo de células tumorales de Leydig (I-10)	"
Tiras arteriales coronarias (cerdo, vaca)	"
Cultivo de células de huesos fetales (rata)	"
Cultivos celulares de fibroblastos de pulmón transformados (WI-38) (VA13-2RA) (humanos)	"
Cultivo de células de glioma (132-1N1) (humana)	"
Eritrocitos (pavo)	"
Médula de bazo (bovino)	"
Adipocitos (rata)	INHIBICION
Cortes de miocardio ventricular (rata)	"
Cultivos celulares de astrocitos piteliales de cerebro (ratón)	"

(E_{GDP}), que puede ser activo, en las células donde la adenosina activa la adenilato ciclasa. La adenosina facilitaría así la liberación del GDP con lo cual la enzima recuperaría el estado E_o . Así, en las células en que la adenilato ciclasa se activa por adenosina, el estado E_{GDP} sería inactivo y no podría ser estimulado por hormonas, ni GTP, a menos que la adenosina estimulase el paso del estado E_{GDP} al estado E_o , lo que permitiría una posterior activación; sin embargo, en células donde el estado E_{GDP} es activo, la aceleración por adenosina del paso a E_o supondría una pérdida de actividad. Esto podría explicar que altas concentraciones de GTP sean inhibitoras de la adenilato ciclasa en tejido adiposo, ya que altos niveles de GTP inducirían una aceleración del paso E_{GTP} (muy activo) a E_{GDP} (poco activo), con la consiguiente pérdida de actividad. Por otra parte, sólo en estas condiciones sería posible apreciar la inhibición por adenosina, ya que se necesitaría una acumulación apreciable de enzima en estados E_{GDP} para que se pudiese notar una ligera pérdida de actividad.

El modelo se esquematiza en la fig. 10, junto con la interpretación de la influencia de otras sustancias, como la toxina colérica y las prostaglandinas. La interpretación de los resultados sobre el medio de actuación de la adenosina a través del sitio "P" sigue sin aclararse. Se ha propuesto, sin embargo, considerar este sitio como receptor de nucleótidos de adenina, posiblemente AMP, en lugar de la adenosina misma.

Por otra parte todo hace suponer que el sitio "P" se encuentra en el lado interno de la membrana, posiblemente ligado a la región catalítica de la enzima. Más aún, es posible que el sitio "P" coincida con el centro catalítico y que la inhibición pueda deberse a mecanismos competitivos complejos. Varios autores han notado que la inhibición por adenosina vía sitio P se incre-

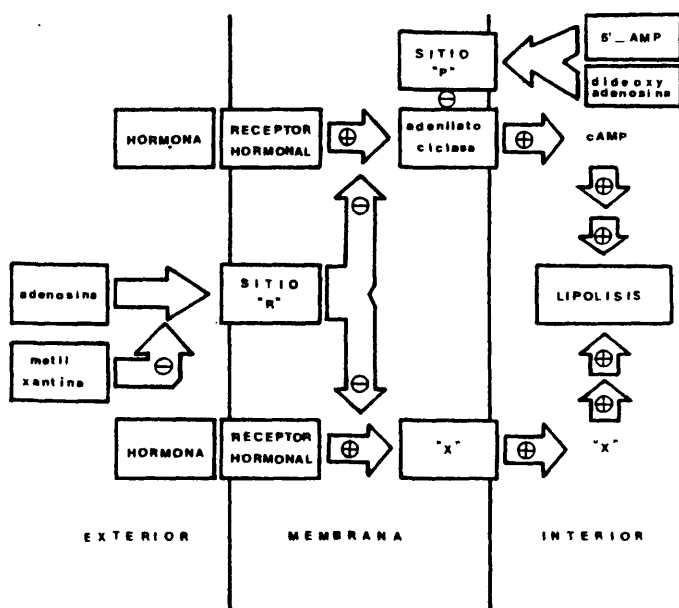


FIGURA 9. Regulación de la lipólisis por adenosina en adipocitos (164).

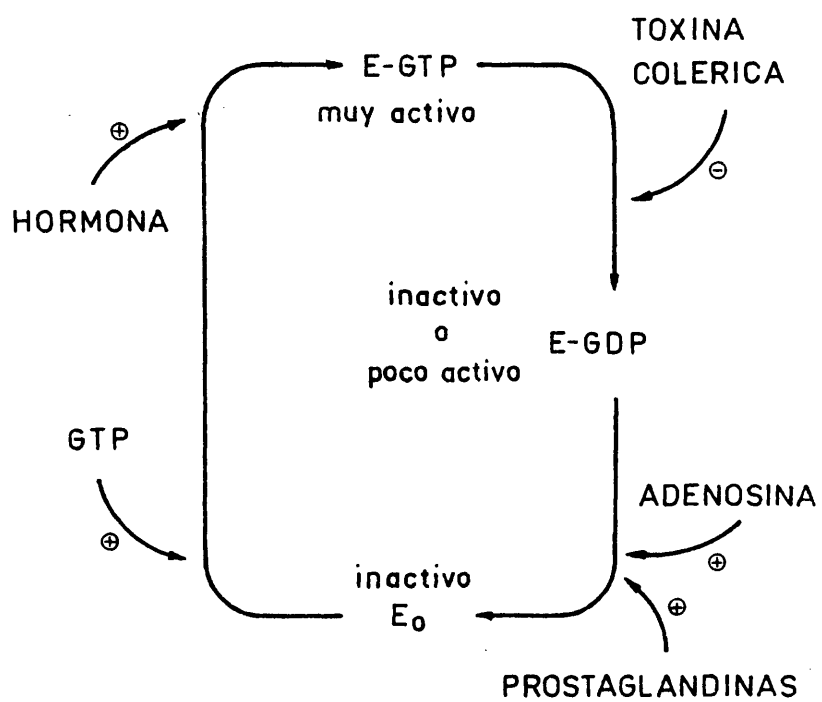


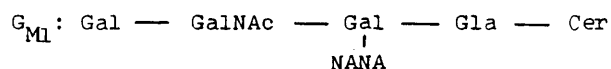
FIGURA 10. Regulación de la adenilato ciclasa por adenosina via sitio "R".

menta por Mg^{2+} y se encuentra presente en extractos solubles (192, 194, 195). Esto junto con la imposibilidad de separar el sitio "P" del componente catalítico de la adenilato ciclasa ha conducido a Premont y col (195) a sugerir que el sitio "P" y la actividad catalítica se encuentran localizados en el mismo componente de la enzima. Ultimamente Welton y Simko (196) han demostrado que en pulmón de cobaya, el efecto inhibidor de la adenosina vía sitio "P", también está mediado por cationes (Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ca^{2+}), viéndose potenciado el efecto por el GTP, aunque no así por neurotransmisores.

1.2.10. ACTUACION DE LA TOXINA COLERICA

La toxina colérica es una enterotoxina del Vibrio cholerae, responsable de la diarrea acuosa, característica clínica del cólera. La toxina es una proteína oligomérica de aproximadamente 84 000 D, compuesta de tres péptidos A_1 , A_2 y $B.A_1$ (23 500 D) está unido por un puente disulfuro a A_2 (5 500 D), formando la subunidad A, que junto con cinco subunidades B (11 600 D) constituyen el oligómero. Hoy día se conoce que la toxina colérica ejerce sus efectos en las células a través de la activación de la adenilato ciclasa.

La primera etapa en la acción de la toxina es la unión de ésta a la superficie celular como resultado de su interacción con el gangliósido G_{M1} presente en la membrana plasmática:



Existe una evidencia clara de que los gangliosidos G_{M1} actúan como receptores de superficie para la toxina colérica, interaccionando con la subunidad B, siendo la presencia del ganglio

sido lo que determina la sensibilidad de la célula a la misma (197, 198, 201). Ahora bien, el mecanismo por el cual la toxina accede a la adenilato ciclasa o a su componente regulador permanece aún oscuro. Resulta lógico pensar que una unión multivalente de las subunidades B a la superficie de la membrana ha de facilitar de alguna manera la movilidad lateral en la superficie o la penetración a través de la membrana de algún componente de la toxina. Por otra parte se ha visto que mientras que, en preparaciones celulares la subunidad A y el péptido A_1 poseen sólo una fracción de la actividad de la holotoxina, cuando se trabaja con homogeneizados o preparaciones de membranas, la activación de la adenilato ciclasa es independiente de los gangliosidos G_{M1} y de las subunidades B (200). De todas formas, aunque el gangliosido G_{M1} es responsable y necesario para la unión específica de la toxina a la superficie celular, aparentemente no funciona como un receptor en el sentido en el que el término se utiliza para referirse a los receptores que forman parte obligada del mecanismo, a través del cual, los agonistas β -adrenérgicos y algunas hormonas peptídicas activan la adenilato ciclasa.

La activación de la adenilato ciclasa en preparaciones libres de células, está catalizada por la subunidad A o el péptido A_1 de la toxina, y se cree que aunque en la toxina intacta A_1 y A_2 están unidas, probablemente esta unión se rompa por reducción del único puente disulfuro, que les ata, para que pueda mostrarse activa. Por otra parte, la presencia de NAD y GTP parecen ser necesarias para alcanzar la máxima activación de la adenilato ciclasa, así como también se requiere para la enzima de cerebro la adición de una proteína reguladora dependiente de calcio de bajo peso molecular (calmodulina).

El requerimiento de concentraciones micromolares de NAD es bastante específico, si bien, puede ser parcialmente reemplaza

do por otros nucleótidos similares. Al igual que la exotoxina A de *Pseudomonas* y la toxina diftérica, la toxina colérica cataliza la transferencia de ADP-ribosa procedente del NAD a argininas presentes en proteínas.

La actividad ADP-ribosiltransferasica cromatografía con la subunidad A ($A_1 + A_2$) de la toxina colérica y puede ser detectada en las preparaciones del péptido A_1 , siendo por lo tanto independiente de los péptidos A_2 y B y de otros componentes celulares o gangliosidos (205).

A la vista de esto se propuso que la activación se produciría por la ADP-ribosilación de la adenilato ciclasa, bien en la subunidad catalítica o en su componente regulador.

Cassel y Pfeuffer (124), teniendo en cuenta que el GTP incrementa el efecto de la toxina han propuesto y demostrado que la toxina colérica ejerce la activación gracia a la ADP-ribosilación de la GTPasa asociada a la enzima, inhibe la hidrólisis del GTP, incrementando de esta forma la proporción del complejo adenilato ciclasa-GTP (muy activo). Mediante experimentos con ^{32}P -NAD se ha podido aislar una proteína de 42 000 D que aparece ADP-ribosilada y que une GTP, la cual parece ser el componente responsable de la activación de la adenilato ciclasa por GTP.

Utilizando preparaciones de adenilato ciclasa de cerebro se ha observado que era necesario, además de NAD y GTP, la presencia de una proteína de bajo peso molecular, estable al calor y dependiente de Ca^{2+} para que la toxina colérica ejerciera una demostrable activación de la enzima (199), a la cual se ha denominado calmodulina.

Por otra parte, se ha visto que la entorotoxina labil al calor de *E. coli*, conocida como LT puede activar la adenilato ciclasa por un mecanismo similar al descrito para la toxina colérica (202, 203). La presencia de la misma actividad ADP-ribosi-

lante en la enterotoxina LT afianza cada vez más la hipótesis de que ambas toxinas activan la adenilato ciclasa por este proceso.

Por último, señalaremos que Moss y Vaughan (204) han aislado en eritrocitos de pavo una proteína de bajo peso molecular labil al calor que cataliza la activación NAD-dependiente de la adenilato ciclasa, la hidrólisis de NAD a ADP-ribosa y nicotina y la transferencia del grupo ADP-ribosilo del NAD a la arginina, a proteínas tales como histonas y lisozima y a poliarginina. La Km para el NAD en la reacción de la ADP-ribosiltransferasa fue de 30 μ M, significativamente menor que la observada con la toxina colérica (4mM) y con la enterotoxina LT (8 mM). Aunque el papel que desempeña esta enzima en los eritrocitos es aún desconocido, su descubrimiento puede soportar el punto de vista de que mecanismos similares a los que emplean la toxina colérica y la enterotoxina de E. coli para dar cuenta del proceso patológico, pueden ser empleados por las células de vertebrados para la activación fisiológica de la adenilato ciclasa.

1.2.11. REGULACION POR PROSTAGLANDINAS

Más de una década ha pasado desde que se observó por primera vez que la prostaglandina PGE₁ y en menor medida la PGE₂ eran potentes inhibidores de la agregación plaquetaria (206-208). Poco después se asoció este efecto inhibidor de las prostaglandinas E y más recientemente de las D con una elevación de los niveles plaquetarios de cAMP (209-212).

A partir de esos primeros años son muchos los estudios en los que se ha demostrado que las prostaglandinas pueden modificar los niveles intracelulares de cAMP de distintos tejidos y líneas celulares (213, 214). Sin embargo, como las prostaglandinas pueden ejercer un efecto mixto se pensaba que el aumento de los niveles de cAMP podía deberse a una estimulación directa

sobre la adenilato ciclasa (215, 216) en tanto que su disminución se achacaba a otros mecanismos por el momento desconocidos (216). Al mismo tiempo algunos datos ponen de manifiesto que en ciertos tejidos las prostaglandinas son obligados intermedios en la acción de las hormonas polipeptídicas como estimuladoras de la adenilato ciclasa (217, 218). Dada la complejidad de los efectos mediados por las prostaglandinas, resulta difícil aventurar una hipótesis acerca de sus mecanismos de actuación.

Algunos de los trabajos más interesantes han ido encaminados hacia la búsqueda de los receptores de prostaglandinas; así Brunton y col (220) trabajando con tres líneas celulares de múridos y Perkins y Ortmann (219) trabajando con células de astrocitoma (1321N1) han aportado datos convincentes en este sentido, si bien, el orden de potencia de las prostaglandinas en cuanto a la activación de la adenilato ciclasa es diferente, siendo en el primer caso $PGE_1 \gg PGA_1 > PGE_2 > PGF_{2\alpha}$ y en el segundo $PGE_1 > PGE_2 > PGA_1 \gg PGF_{2\alpha}$. Por otra parte, Kantor y col (221) han encontrado que en una misma célula pueden existir dos tipos de receptores, uno inhibidor y otro estimulador. La pretendida existencia de tales receptores estructuralmente específicos está basada, en buena medida, en la acción de antagonistas específicos para las prostaglandinas como el ácido 7-oxa-13-prostanoico, la indometacina y otros antiinflamatorios no esteroídicos.

En línea con estos estudios son de particular interés los efectos observados de las prostaglandinas y algunos compuestos relacionados como tromboxanos y PG endoperóxidos sobre el sistema nervioso y líneas celulares derivadas del mismo (148). El efecto más general es la elevación de los niveles de cAMP, si bien como ocurre en los ganglios simpáticos y en el cerebelo, las prostaglandinas ejercen una acción inhibidora sobre la respuesta hormonal via cAMP. Aunque se ha querido ver en las prostaglandi-

nas un candidato para la gran lista de los neurotransmisores, ya que pueden ser liberados por estimulación nerviosa (222), hoy se piensa que su funcionalidad esta ligada más a la regulación de los procesos intracelulares que a la transmisión intercelular.

Los estudios realizados por Gorman y col (223) sobre la agregación plaquetaria son altamente significativos, en cuanto a la complejidad de los mecanismos. Estos autores proponen que si bien, las prostaglandinas PGE_1 y PGD_2 pueden estimular la adenilato ciclasa de las plaquetas, no serían estas las que actuarían "in vivo", ya que sus niveles son bajos, si no que sería la prostaciclina PGX la que mediante el aumento de los niveles de cAMP impediría la agregación plaquetaria. Por otra parte, la prostaglandina endoperóxido PGH_2 previa transformación por la tromboxano sintetasa en tromboxano TXA_2 sería la que induciría la agregación, previa disminución de los niveles de cAMP. Ahora bien, esta disminución se haría de forma indirecta incrementando los niveles intracelulares de Ca^{2+} e inhibiendo mediante éste la actividad de la adenilato ciclasa. También dentro del campo de la estimulación o inhibición de la agregación plaquetaria merece la pena destacar los estudios de Selzman y col (224) sobre gran número de agentes que pueden influenciar estos procesos poniendose claramente de manifiesto el papel central que la regulación de los niveles de cAMP juega en los mismos.

Al igual que ocurre con las hormonas, neurotransmisores, adenosina y toxina colérica se ha observado que la actuación de las prostaglandinas se ve favorecida en presencia de GTP (172, 225-228). Esto ha conducido a postular que la acción de las prostaglandinas sobre la adenilato ciclasa se lleva a cabo a través del componente regulador dependiente de GTP. Blume y Foster (226) propusieron un mecanismo de acción idéntico para la adenosina y las prostaglandinas basandose en estos principios, que mas tarde

ha sido recogido y ampliado por Fain y Malbon (164), según puede verse en la fig. 10.

1.2.12. IMPORTANCIA DE LOS LIPIDOS

El papel de la estructura y composición de la membrana lipídica en la regulación de la adenilato ciclasa es una de las áreas más confusas y menos documentadas en el estudio de la enzima. La observación primaria de esta participación la constituye el hecho de que la solubilización de la membrana o la adición de agentes que puedan alterar su estructura, conduce a una pérdida total o parcial de la respuesta funcional a las hormonas.

Lo que resulta evidente a la vista de los datos hasta ahora obtenidos es que en el acoplamiento entre el receptor hormonal y la adenilato ciclasa no están implicados ni el potencial de membrana ni procesos de transporte a través de la misma (exceptúese lo visto en las bacterias), lo que no supone que el cAMP por sí mismo no pueda estar implicado en la regulación de numerosos procesos de transporte (229). Aunque Moore y Wolff (230) han demostrado que varios ionóforos pueden desacoplar la activación de la adenilato ciclasa por TSH, es posible sin embargo, que a las altas concentraciones utilizadas, el efecto sea un reflejo de la rotura de la membrana y no una consecuencia del aumento de la permeabilidad, ya que a las concentraciones a las que son capaces de producir desacoplamiento de la fosforilación oxidativa son incapaces de alterar la estimulación por catecolaminas (52).

Muchas de las primeras descripciones del efecto de los fosfolípidos sobre preparaciones de adenilato ciclasa solubilizadas o perturbadas por diferentes agentes (43, 169, 231-235) han carecido de la necesaria reproducibilidad. Los mejores y más recientes estudios en este campo son los que han realizado Rodbell y col (236, 237) sobre los efectos del tratamiento de membranas

de hígado de rata con fosfolipasa C y fosfolipasa A_2 , encontrando que dicho tratamiento impide la estimulación de la adenilato ciclase por glucagón sin que apenas afecte la respuesta al fluoruro. Concomitantemente, se pierde con fosfolipasa C el efecto del GTP sobre la unión del glucagón, en tanto que con fosfolipasa A_2 no se pierde, aunque si se reduce la afinidad por el receptor. Sin embargo, el tratamiento con filipina no disminuye ni el efecto del GTP sobre la unión, ni la afinidad por el receptor aunque, en efecto, impide el acoplamiento receptor-enzima y disminuye la capacidad de estimulación por GppNHp. Similares resultados con filipina han sido presentados por Puchwein y col (238). Una aproximación alternativa para evaluar el requerimiento del entorno lipídico en la modulación de la enzima ha sido variar la composición de los fosfolípidos de las membranas mediante alteraciones metabólicas. Engelhard y col (239, 240) crecieron fibroblastos LM en medios suplementados con etanolamina o colina y ácidos grasos o análogos de etanolamina y colina, observando que las diferencias en la composición de ácidos grasos o cabezas polares de los lípidos de la membrana afectaban tanto a la actividad basal de la adenilato ciclase como a la respuesta al NaF y prostaglandina PGE_1 .

Varios grupos han intentado correlacionar la actividad de la enzima con el estado físico de los lípidos endógenos de las membranas, estudiando la dependencia de la temperatura, de la catálisis en presencia de distintos activadores (241-247). Estudios sobre la actividad enzimática presente en membranas hepáticas en presencia de fosfolípidos exógenos y estimuladas por glucagón en función de la temperatura, han permitido relacionar las transiciones de la representación de Arrhenius con las propiedades de los lípidos utilizados (248, 249). Bakardjieva y col (250) empleando membranas enriquecidas en DMPC, DOPC, DPPC, han demostrado que se produce una disminución de la afinidad de la unión del isopro

terenol a los receptores β -adrenérgicos.

Orly y Schramm (251) han encontrado que los ácidos grasos $\Delta 9,10$ y $\Delta 11,12$ cis-monoin saturados estimulan la adenilato ciclase de eritrocito de pavo. Basándose en este hecho Levitzki y col (252, 253) han observado que el ácido cis-vacénico aumenta la constante de velocidad de la activación de la enzima de estas membranas por GppNHp en presencia de epinefrina, estando el incremento inversamente relacionado con la microviscosidad de la bicapa. Estos resultados indican que la interacción del receptor y la enzima, controlada por la velocidad de difusión lateral y por ende por la viscosidad de la membrana, es el factor limitante de la velocidad de activación por GppNHp en presencia de hormona.

Por otra parte, Fain y col (254, 255) han demostrado que los ácidos grasos libres en determinadas circunstancias pueden inhibir la adenilato ciclase, lo que podría servir como regulador "feedback" para controlar la acumulación de cAMP producida por agentes lipolíticos.

El efecto de la simple adición de fosfolípidos a las preparaciones de adenilato ciclase ha conducido a diferentes resultados. Lad y col (237) han encontrado que la lisolecitina a bajas concentraciones activa la enzima aunque se inhibe a concentraciones elevadas. Shier y col (256) encontraron por el contrario que la lisolecitina es inhibidora incluso a bajas concentraciones.

1.2.13. LA ADENILATO CICLASA EN BACTERIAS

Al igual que ocurre en los tejidos de mamíferos la adenilato ciclase se encuentra asociada a las membranas bacterianas, si bien esta asociación no parece ser tan intensa, ya que es posible solubilizarla simplemente por extracción con solucio

nes tampón (257). Ide (26) ha dividido las bacterias en dos clases según que la mayor parte de la adenilato ciclasa se encuentre en la fracción particulada o en el sobrenadante después de la rotura de la bacteria, lo que indica que la fuerza de la unión de la enzima a la membrana puede variar según los géneros.

Sus requerimientos catalíticos son idénticos a los que poseen otros sistemas, con la circunstancia de que en este aspecto la enzima de bacterias es la mejor conocida, ya que como ha sido mencionado es la única adenilato ciclasa que ha podido ser purificada y cristalizada (49). En general, no son afectadas por NaF aunque existen excepciones como la enzima de Streptococcus salivarius (101), que se activa por el anión y la de Bordetella pertussis (261) que se inhibe.

Resulta por otra parte evidente que dado el papel que el cAMP desempeña en los procesos nutritivos en bacterias, los mecanismos que controlan la adenilato ciclasa en este caso serán muy diferentes a los mecanismos que actúan a tal efecto en mamíferos. En contraste con estos últimos se conoce muy poco acerca de la regulación intrínseca y extrínseca de la actividad de la enzima en bacterias.

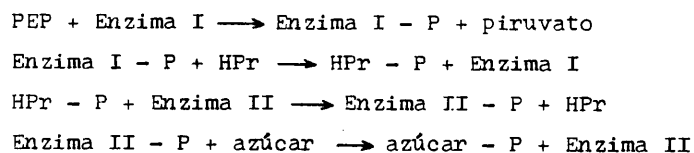
En Escherichia coli los niveles de cAMP fluctúan marcadamente en función de la fuente de carbono presente en el medio de cultivo (258). Cuando las bacterias detienen su crecimiento como consecuencia de la consunción de la fuente de carbono, se produce un aumento de los niveles de cAMP. Parece, pues, que la transición entre el periodo de crecimiento y el estado estacionario se caracteriza por una elevación del cAMP en la célula (259). Efectos de este tipo se observan mejor cuando se cultivan las bacterias en medios con varios nutrientes carbonados (260).

En Escherichia coli la regulación de los niveles de cAMP por los azúcares es un fiel reflejo de los cambios de actividad

de la adenilato ciclasa (262). Así en las células intactas (263) o permeabilizadas (258) la glucosa inhibe la adenilato ciclasa, sin embargo, cuando se trabaja con células rotas la glucosa no afecta a la actividad de la enzima (258).

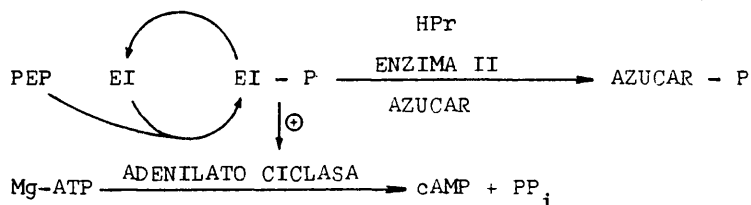
Por otra parte, se ha demostrado que en Brevibacterium liquefaciens el piruvato tanto "in vivo" como "in vitro" activa la adenilato ciclasa (49, 99, 264, 272). Como activadores en este sistema se han descrito también algunos α -cetoácidos (α -cetobutirato, α -cetovalerianato), ácidos monocarboxílicos (acetato, acrilato, propionato, butirato) y aminoácidos (glicina, alanina) (49). Si bien parece que en el caso de la alanina la activación transcurre "in vivo" previa transformación de la misma en piruvato por la D-aminoácido oxidasa (264).

En células de Escherichia coli tratadas con tolueno, el PEP puede activar la enzima (265). En estas bacterias parece que los mecanismos de regulación de la adenilato ciclasa se han esclarecido, en parte, gracias a los trabajos de Peterkofsky y col (262, 265-267, 270) quienes propusieron que la disminución de los niveles de cAMP que se observa cuando un azúcar se encuentra presente en el medio de cultivo, era debida a la interacción de algún componente del sistema de transporte de azúcares con la adenilato ciclasa. Los efectos más pronunciados fueron observados con los azúcares transportados por el sistema PTS ("phosphoenolpyruvate: sugar phosphotransferase system"). Este sistema es un complejo multienzimático de proteínas ligadas a membrana y solubles (268), cuya actuación puede resumirse en el siguiente esquema:



Las proteínas Enzima I y HPr son solubles y la Enzima II está ligada a membrana, siendo ésta específica para cada azúcar.

Los estudios más recientes utilizando mutantes defectuosos en algún componente del sistema PTS (260, 269) han conducido al esclarecimiento parcial del mecanismo por el cual se inhibe la adenilato ciclasa y que puede resumirse en el siguiente esquema:



Este mecanismo predice que los factores que estimulen la fosforilación de la Enzima I, como el PEP, serán activadores de la adenilato ciclasa, en tanto que los que estimulen su desfosforilación como son los azúcares y el piruvato disminuirán la biosíntesis del cAMP. Sin embargo, la contradicción entre el efecto activador del piruvato en Brevibacterium liquefaciens e inhibidor en Escherichia coli hace dudar de la validez general de este mecanismo.

Por último señalaremos que Hewlett y col (271) han descrito que la adenilato ciclasa extracitoplásmica de Bordetella pertussis puede ser activada por un factor presente en hígado de bovino y eritrocitos de oveja, conejo y humanos, estable al calor y al tratamiento ácido o básico, sensible a pronasa y tripsina y con un peso molecular de 40 000 D. A este respecto, la naturaleza patógena de esta especie bacteriana para el hombre puede contemplarse a la luz de la simultánea presencia en algunas circunstancias de activador y bacteria.

1.2.14. DESARROLLO Y DIFERENCIACION

Rosen y col (273) fueron los primeros en observar que la expresión de la sensibilidad de la adenilato ciclasa a las hormonas, podía ocurrir en un estado de desarrollo posterior a la expresión de la actividad catalítica. Schmidt y col (274) aportaron también datos concluyentes acerca de la diferencia en el tiempo de desarrollo de las respuestas de la adenilato ciclasa de cerebro a catecolaminas y la aparición de la actividad basal, sin embargo, no se ha podido establecer si el fenómeno se debe a la ausencia del componente receptor o a la falta del componente de acoplamiento. Sobre este particular los trabajos de Perkins y col (51, 123) demuestran que el receptor catecolamínico puede estar presente como tal en el cortex de cerebro de ratas en desarrollo antes de su acoplamiento con el componente catalítico de la adenilato ciclasa. Entre los días 10 y 12 postnatales de la rata se produce un marcado incremento de la sensibilidad de la enzima a la norepinefrina, lo que indicaría la fase inicial del acoplamiento; sin embargo, antes del día 11 el efecto de la norepinefrina se puede observar en presencia de adenosina, lo que sugiere que en los primeros días después del nacimiento el acoplamiento entre el receptor y la enzima se hace a través de mecanismos que requieren la presencia de otros cofactores.

Estudios más recientes con adipocitos de rata (275) de muestran que a medida que se produce el envejecimiento del animal disminuye el número de receptores β -adrenérgicos así durante el periodo de maduración 1-8 meses el número de receptores aumenta proporcionalmente a la superficie celular alcanzando un máximo de 40 800 receptores por célula. Por el contrario, de los 12 a 30 meses de vida aunque el tamaño de la célula permanece invariable el número disminuye hasta 7 200 receptores por célula. Estas modificaciones están acompañadas de una pérdida de sensibilidad de la

adenilato ciclasa a las catecolaminas, aunque la respuesta de la enzima al NaF no varía significativamente desde el primer mes de vida. Esto indica que los receptores y componentes catalíticos se desarrollan independientemente.

Sicard y Aprille (276) han investigado el comportamiento del sistema en el desarrollo del hígado de rata concluyendo que la sensibilidad al glucagón durante los últimos días de la gestación no está limitada por el desarrollo de los sitios guanídicos de la enzima. El periodo prenatal de 7 a 4 días se caracteriza por un incremento del número de receptores o de las unidades que realizan el acoplamiento con la enzima, mientras que, en el periodo perinatal los receptores y la enzima se desarrollan al unísono. Es de resaltar, además, que la mayor actividad basal se observa en los primeros días después del nacimiento.

También en el pulmón de rata (277) se ha observado que la actividad basal máxima de la enzima se alcanza a los pocos días después del nacimiento y permanece elevada hasta la madurez. Simultáneamente se ha detectado la presencia de algún factor de tipo protéico, de tal suerte que sus niveles son bajos durante la gestación o los primeros días de vida en que la actividad basal es baja y la norepinefrina y el NaF produce una activación máxima, mientras que cuando estos factores citoplásmicos aumentan, la actividad basal de la enzima se eleva y la activación por norepinefrina y NaF es menor. Este factor o factores citoplásmicos no parece ser ni fosfodiesterasa, ni el regulador dependiente de GTP, ni la calmodulina. Factores análogos, o relacionados han sido detectados también en hígado (278-281), corazón (280) y adipocitos (67, 282).

Otros estudios del desarrollo ontogénico de la adenilato ciclasa se han realizado en varios tejidos del cerdo (283), tejido vascular de rata (284), hígado (285-287), cerebro (288, 289),

corazón (290), retina (296) y otros tejidos (288, 290-292). Aunque es difícil generalizar se puede afirmar que, en general, el cAMP incrementa marcadamente sus niveles después del nacimiento para decrecer después con la edad, en tanto que, la actividad basal de la adenilato ciclasa también se incrementa después del nacimiento pero no suele variar mucho con el desarrollo, aunque sí lo hace su capacidad de respuesta a las hormonas, que es alta en los días próximos al nacimiento y decrece después con la edad (51, 123, 273-277, 285-287, 292-295).

Otro aspecto interesante lo constituye los estudios realizados en cultivos celulares sobre la influencia de los nucleótidos cíclicos en el desarrollo de los mismos y sus alteraciones patológicas.

Los cultivos de fibroblastos constituyen un sistema adecuado para tales investigaciones siendo en ellos donde se ha realizado el mayor número de trabajos, demostrándose que los niveles de cAMP disminuyen en los fibroblastos transformados por virus (297-301). Si estos bajos niveles fueran responsables de algunas de las propiedades de las células transformadas, debería ser posible alterar estas propiedades elevando el contenido intracelular del cAMP. De hecho, esto es lo que parece ocurrir, ya que la morfología anormal, el crecimiento rápido, el decrecimiento de la adhesividad y el incremento de la aglutinabilidad de las células tumorales revierten hacia comportamientos normales (297, 30-304). Esto podría indicar que las alteraciones en el metabolismo del cAMP son en cierta forma responsables del proceso de transformación.

Muchas líneas de células normales crecen en cultivo logarítmicamente hasta que llegan a establecer contacto entre sí. En este momento se detiene el crecimiento o transcurre a menor velocidad. Este proceso se conoce con el nombre de inhi-

bición por contacto o inhibición del crecimiento dependiente de la densidad. Está claramente establecido que cuando se produce la inhibición, los niveles de cAMP se hallan muy elevados (298, 300, 305, 306), lo cual indicaría que este incremento del nucleótido sería el responsable de la detención del crecimiento. Para mayor confirmación se ha encontrado que los procesos que revierten la inhibición del crecimiento, como son, la adición de suero fresco y el tratamiento con proteasas también disminuyen los niveles de cAMP (294, 305, 307); las células transformadas, sin embargo, continúan creciendo hasta alcanzar elevadas densidades de población y no muestran elevación en los niveles de cAMP lo que indica que la transformación impide el ejercicio de los mecanismos de control del crecimiento impidiendo que la célula alcance los niveles de cAMP necesarios para detenerlo. Esto parece debido a que la célula transformada pierde la capacidad de elevar la actividad de adenilato ciclasa más que a un aumento de la actividad fosfodiesterásica, como se ha demostrado en células del tipo KNRK, MNRK, CEF-RSV-BH y CEF-RSV-SR (301).

Anderson y Pastan (301) sugieren la posibilidad de que unos factores citoplásmicos que denominan (MAC) sean junto con la prostaglandina PGE, los responsables del incremento de la actividad de adenilato ciclasa en células normales. Las células transformadas poseen niveles más bajos de estos factores moduladores (MAC); o bien, no responden a los mismos. Posiblemente las alteraciones en el contenido de ácido siálico, glicolípidos y glicoproteínas de las células transformadas sean los responsables del decrecimiento en la actividad de la adenilato ciclasa. Un modelo que recoge las diferentes alteraciones que los virus de sarcoma pueden causar en la adenilato ciclasa de fibroblastos ha sido propuesto por Anderson y Pastan (301).

Otros aspectos de la influencia del calcio y los nucleos

tidos cíclicos en el control de la proliferación han sido revisados por McManus y col (308) y Ryan y Heidrich (313).

Según Dulbecco y col (309) el cAMP extra o intracelular parece jugar un papel muy importante como señal iniciadora de la formación de agregados de células estratificadas en cultivos de células LA7. Sugerencias análogas han sido hechas por otros investigadores (310-312).

El cAMP disminuye la proliferación de células de neuroblastoma y glioma y causa la expresión de características más diferenciadas y menos anaplásticas (148).

Aunque aún se está muy lejos de comprender como lleva a cabo el cAMP su acción sobre los procesos de diferenciación, lo cierto es que estos estudios han conducido ya a la obtención de magníficos resultados en otros aspectos, como la obtención de células transformadas que presentan deficiencias en alguno de los componentes de la adenilato ciclase (314) lo que ha permitido, a Ross y Gilman (52) plantear un complejo modelo estructural de la enzima.

Los experimentos de Bourne y col (318) son claro ejemplo de como la selección de mutantes celulares carentes de alguno de los sistemas implicados en el metabolismo del cAMP puede contribuir al esclarecimiento de los procesos que dan origen a la detención de la proliferación celular.

Parker (185) ha propuesto como resultado de sus investigaciones sobre los efectos de sustancias mitógenas en linfocitos una teoría de acción bifásica para el cAMP sobre la proliferación celular. La opinión general es que los niveles de cAMP en las células transformadas son inferiores a los normales y por ello no se detiene el crecimiento sin embargo, existen algunos ejemplos en los cuales la acumulación de cAMP favorece la transformación (273). A la vista de esto se postula que, posiblemente, el efecto

inicial de la transformación es un incremento del cAMP en un determinado compartimento intracelular, como consecuencia de alguna perturbación a nivel de transporte a través de permeáforos. Una vez superada esta primera etapa, cuando la célula se hace totalmente neoplásica es cuando se produce la bajada en los niveles de nucleótido.

Por último, merece la pena señalar que lo más probable es que en la regulación de los procesos de desarrollo y diferenciación intervengan de forma coordinada el cAMP y el cGMP. Sobre este particular pueden verse varias revisiones en (315-317).

1.3. GUANILATO CICLASA

1.3.1. DISTRIBUCION

Desde que la guanilato ciclasa se detectara por primera vez por tres grupos distintos de investigadores en 1969 (11, 12, 319) hasta nuestros días, son muchos los sistemas biológicos que se han analizado para detectar su actividad. La guanilato ciclasa ha sido identificada en todos los tejidos de mamífero excepto en el esperma (320). Se encuentra ampliamente distribuida por todo el reino animal (321, 322), incluyendo insectos (323-325), moluscos (326), aves (326) y peces (326). También se ha encontrado en bacterias (327-329) y aunque todavía no ha sido posible su evaluación en plantas, sería lógica su presencia dada la existencia detectada de cGMP (330).

La distribución de la enzima después de la rotura celular varía de unos tejidos a otros; desde totalmente soluble, en plaquetas (331), a ser totalmente particulada en riñón de oveja (332) y esperma de erizo de mar (333), siendo lo más frecuente que la enzima se distribuya entre ambas fracciones (322). La actividad en la fracción particulada se ha identificado con la membrana plasmática, retículo endoplásmico, mitocondria y núcleos (334). Igual que ocurría con la adenilato ciclasa soluble de bacterias, hoy se piensa que la guanilato ciclasa se encuentra originalmente unida a las membranas y que su solubilidad es una mera consecuencia del proceso de homogeneización (334). Las propiedades diferenciales de la enzima soluble y particulada que en algún momento se consideraron señales distintivas de especies diferentes de enzimas, han sido puestas en entredicho por Garbers (335), al mostrar que tales propiedades, lejos de ser intrínsecas, vienen condicionadas por el entorno.

En un tejido particular, es posible encontrar una selec

tiva acumulación de la enzima en estructuras discretas o tipos celulares determinados. Así, se encuentra una alta actividad en la retina y dentro de ésta en estructuras ciliares, en sinaptosomas, glomerulos, microvellosidades, flagelos, etc (334).

Por último, señalaremos que algunos estudios realizados sobre la distribución de la enzima en la fracción particulada o soluble en función de determinadas circunstancias, como regeneración, transformación, nacimiento, tratamientos hormonales, etc (334), han complicado las teorías acerca de la regulación de la enzima, ya que se considera la interconversión de estados como posible mecanismo regulador.

1.3.2. ESTRUCTURA

La enzima ha sido purificada de diversas fuentes y los pesos moleculares asignados varían ampliamente (tabla 9).

TABLA 9: Pesos moleculares asignados para la guanilato ciclasa de diferentes fuentes

<u>PROCEDENCIA</u>	<u>PESO MOLECULAR</u>	<u>REFERENCIA</u>
Escherichia coli	30 000 D	329
Caulobacter crescentus	140 000 D	327
Médula de riñón de rata (soluble)	154 000 D	336
Plaquetas humanas	180 000 D	337
Esperma de erizo de mar	182 000 D	335
Médula de riñón de rata (particulada)	310 000 D	338
Pulmón de rata	700 000 -900 000 D	339

La enzima más pura hasta hoy lograda es la que Garbers obtuvo de fracción soluble de pulmón de rata (340). Esta enzima

Fue purificada 23 000 veces, hasta homogeneidad, presentando una actividad de 700 nmol/min/mg de proteína a 37°C en presencia de 4.8 mM de $MnCl_2$ y 100 μ M de GTP. Su peso molecular es de 151 000 D pero en electroforesis en presencia de SDS se obtienen dos bandas de 79 400 D y 74 000 D, de lo que se deduce que la enzima se encuentra como dímero en forma soluble.

Otros datos estructurales han sido estudiados por Neer y col (336, 338) en la enzima soluble de médula de riñón de rata, encontrando para la enzima un radio de Stokes de 54 Å, un volumen específico parcial de 0.75 ml/g, un valor de f/f_0 de 1.4, una relación axial de 7 y un valor de $S_{20,W}$ de 6.3 s.

La guanilato ciclasa de varias fuentes parece poseer un grupo sulfhidrilo necesario para la actividad, ya que $ZnCl_2$, $CdCl_2$, $HgCl_2$, p-hidroximercuribenzoato, p-cloromercurifenilsulfonato y N-etilmaleimida inactivan la enzima, siendo revertida esta inhibición por ditiotreitól (334). Este sitio parece que es accesible en la célula intacta, ya que la adición de N-etilmaleimida a una suspensión de células provoca una disminución de los niveles de cGMP (334). La importancia de este sitio y su implicación en el sistema de regulación por óxido-reducción serán discutidos más adelante.

1.3.3. CARACTERISTICAS CINETICAS

En sus aspectos cinéticos la enzima se asemeja a su homóloga la adenilato ciclasa y a otras enzimas que utilizan nucleosidotrifosfatos como sustratos. Presenta un requerimiento absoluto de un catión divalente el cual forma con el GTP el verdadero sustrato de la enzima, el complejo Me^{2+} -GTP.

La enzima utiliza Mn^{2+} y Mg^{2+} , indistintamente, como catión, aunque, por norma general, el Mn^{2+} es del orden de diez veces más potente que el Mg^{2+} , el cual puede a veces ser inactivo (341); en algunos casos excepcionales la enzima puede manifestar

su actividad en presencia de Ca^{2+} (339), Fe^{2+} (331, 341), Sn^{2+} , Cu^{2+} y Ni^{2+} (9). Metales tales como Zn^{2+} , Hg^{2+} y Cu^{2+} son habitualmente inhibidores.

La reacción que tiene lugar puede esquematizarse:



La mayoría de las guanilato ciclasas solubles exhiben un comportamiento clásico de cinética de Michaelis-Menten, con un valor de K_m aparente para el Mn^{2+} -GTP comprendido entre 10 y 60 μM . Las fracciones particuladas normalmente exhiben un requerimiento más alto de sustrato y una cooperatividad positiva con unos coeficientes de Hill del orden de 1.5 a 1.75 (334). Los valores de $S_{0.5}$ están comprendidos entre 70 y 300 μM (334).

La enzima puede utilizar como sustrato además del GTP, el dGTP y el ITP originando los correspondientes nucleótidos cíclicos con unas actividades relativas de 1, 0.5 y 0.08 respectivamente (342).

El ATP se ha mostrado como inhibidor en numerosos tejidos (334), siendo, en general, más sensible a esta inhibición la enzima soluble. Esta inhibición se atribuye a una competencia entre el GTP y el ATP por el sitio catalítico. Kimura y Murad (322) han llegado a postular que la guanilato ciclasa soluble, "in vivo", no debe funcionar a menos que existan determinados factores que se impongan a la inhibición por ATP.

Por otra parte existen algunos datos sobre la interacción de los nucleótidos en sitios distintos del centro catalítico (346). Seigel y col (347) han encontrado un efecto estimulador del ATP sobre la guanilato ciclasa microsomal de útero, postulando que la enzima particulada posee un sitio alostérico activador para los nucleótidos. También Mato (343) ha descrito el ATP

como activador de la guanilato ciclasa de D. discoideum sugiriendo un mecanismo de activación por fosforilación. Este mismo grupo de trabajo encontró también un efecto activador por parte del cAMP (344) aunque parece que su acción se produce por un mecanismo distinto al del ATP. En esta línea están los estudios sobre el efecto inhibitor de la proteína quinasa dependiente de cAMP sobre la guanilato ciclasa de cerebelo de rata (345). Si el efecto inhibitor se debe a la fosforilación de la enzima o de otro componente del medio, está todavía sin resolver, aunque se postula la posibilidad de que el proceso afecte al sitio de unión del activador NaN_3 .

1.3.4. REGULACION POR CATIONES

Desde los primeros estudios cinéticos de la enzima se observó que la velocidad de reacción dependía de la relación óptima entre el GTP y el Mn^{2+} . Cuando la concentración de GTP superaba a la de Mn^{2+} se producía una inhibición que podía ser eliminada aumentando la concentración de Mn^{2+} . La enzima soluble presenta una relación óptima $\text{Mn}^{2+}/\text{GTP}$ (4:1), en tanto que la enzima particulada lo hace en menor proporción, (2:1), o incluso no presenta requerimiento alguno de metal libre (334). Estas observaciones han conducido, al igual que la adenilato ciclasa, a postular la existencia de dos sitios distintos de unión para el metal (334, 339, 348).

Con respecto al comportamiento del Ca^{2+} se ha visto que es capaz de estimular la enzima soluble aún en presencia de concentraciones de Mn^{2+} iguales o inferiores a las de GTP; sin embargo, lo que no ha podido ser determinado es si el Ca^{2+} actúa a través del sitio metálico o si al desplazar al Mn^{2+} del complejo con el GTP es el Mn^{2+} el verdadero activador o si el complejo Ca^{2+} -GTP es más efectivo en presencia de pequeñas concentraciones

de Mn^{2+} (339, 348). Sobre la fracción particulada el Ca^{2+} ejerce un efecto inhibitor en presencia de Mn^{2+} (334).

El efecto del Ca^{2+} se puede obtener también con Mg^{2+} . El Mg^{2+} estimula tanto la fracción soluble como la particulada (334).

Existe toda una serie de fenómenos relacionados con los cationes que, si bien no presentan una clara explicación, dan idea de la posible importancia de su intervención en la regulación "in vivo". El Mg^{2+} puede reemplazar al Mn^{2+} como catión o aumentar su poder relativo de activación en determinadas circunstancias como son el tratamiento con Triton X-100 (332), ácidos grasos de cadena larga (349) y azida sódica (350, 351). Por otra parte el efecto activador del Ca^{2+} en presencia de Mn^{2+} antes comentado se pierde cuando la enzima se activa por NaN_3 (351). En contraste, la activación por oxidación espontánea conduce a un incremento de la potencia activadora del Ca^{2+} (352).

Por último señalaremos que los estudios de Garbers y Hardman (346) sobre los efectos de los metales y nucleótidos en la inactivación de la guanilato ciclasa de esperma de erizo de mar por calor o por N-etil-maleimida, aportan tres conclusiones interesantes: (i) La guanilato ciclasa de esperma de erizo de mar une metal libre; (ii) la unión del metal es requerida para la protección por nucleótidos; (iii) la enzima contiene múltiples sitios para unir nucleótidos.

1.3.5. REGULACION POR OXIDACION Y REDUCCION

La primera indicación de que la guanilato ciclasa podía ser regulada por alteraciones de su estado redox fue descrita por Boehme y col (331) al estudiar la activación espontánea y dependiente del tiempo que se producía en la enzima soluble de plaquetas en contacto con el aire. La activación se impedía con la

presencia de DTT. Este fenómeno de activación espontánea se limita exclusivamente a las enzimas solubles, ya que no se ha observado nunca con la enzima particulada (334). Los estudios más completos a este respecto han sido realizados por White y col (353). El proceso parece que implica una oxidación, ya que el incremento de la presión de O_2 en el medio de incubación acelera la activación y la sustitución de O_2 por N_2 la detiene. También el H_2O_2 añadida en presencia de inhibidores de catalasa (KCN) o generada por acción de glucosa oxidasa puede mimetizar la activación espontánea. Los reactivos tiólicos (2-mercaptoetanol, DTT, glutatión, cisteína, dimercaptopropanol) impiden la activación.

Los estudios realizados sobre los mecanismos por los cuales el ácido ascórbico provoca una acumulación intracelular de cGMP (354-356) han conducido al hallazgo de que la forma oxidada de la vitamina C, ácido dehidroascórbico puede servir como activador de la adenilato ciclasa (334, 357). Tanto la enzima soluble como la particulada exhiben en este caso una activación como resultado de la aparente oxidación producida por el ácido dehidroascórbico. Ultimamente se piensa que el verdadero activador puede ser el radical libre monodehidroascorbato, ya que el BHT y BHA, antioxidantes reconocidos por su capacidad de atrapar radicales libres, pueden evitar la estimulación por ascorbato y dehidroascorbato en células intactas (334, 357).

Sin lugar a duda, los modelos más interesantes dentro del campo de la regulación por oxidación-reducción, han surgido del estudio de las nitrosaminas y sustancias nucleófilas como NaN_3 , NH_2OH , $NaNO_2$, fenilhidracina, nitroprusiato, nitrosoureas, nitroglicerina, etc. (334, 358, 359). El descubrimiento por parte de Murad y col (358) que para la activación por NaN_3 se necesitaba la presencia de una proteína que copurificaba con la catalasa y que podía ser sustituida por ésta, y el hecho de que el NO se

comportase como un potente activador han conducido a la creación de un modelo que puede resumirse en la fig 11. Hay que resaltar que las propiedades de la enzima cambian marcadamente cuando se activa, pudiendo en ese caso utilizar indistintamente el Mn^{2+} y el Mg^{2+} como metales, siendo inhibida por el Ca^{2+} y produciendo cAMP a partir de ATP como si de la adenilato ciclasa se tratase. En combinación con esto, los estudios sobre la activación de la enzima por radicales libres del tipo (OH^{\cdot}) (358), también han llevado a postular un modelo que queda reflejado en la fig 12. Este mecanismo podría explicar el porqué algunos procesos y agentes que favorecen la formación del ión superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y del radical hidroxilo (OH^{\cdot}) pueden alterar la acumulación del cGMP en los tejidos. Entre estos procesos se encuentra la fagocitosis y liberación de enzimas lisosomales (360) y la formación de tromboxanos y prostaglandinas (357).

Hasta aquí hemos comentado el efecto activador que sobre la guanilato ciclasa ejercen toda una colección de sustancias oxidantes y el bloqueo que sobre la misma provocan los agentes tióxicos. Pero no hemos de olvidar que existe al menos otro punto de vital importancia para la enzima que necesita encontrarse en su forma reducida, ya que agentes tales como el p-mercuribenzoato, N-etilmeleimida, etc., bloquean la actividad enzimática, siendo revertida esta inhibición por DTT. Los experimentos llevados a cabo por Kraska y col (352) con enzima soluble de útero de rata demuestran que una prolongada oxidación de la enzima puede provocar una respuesta bifásica de activación al comienzo e inhibición al final. Esta inhibición puede entonces ser revertida por DTT. De esto se concluye que deben de existir dos sitios o componentes diferentes susceptibles de oxidación. La oxidación del primero conduce a la activación de la enzima, y puede ser prevenida por agentes tióxicos pero no revertida por ellos. El segun

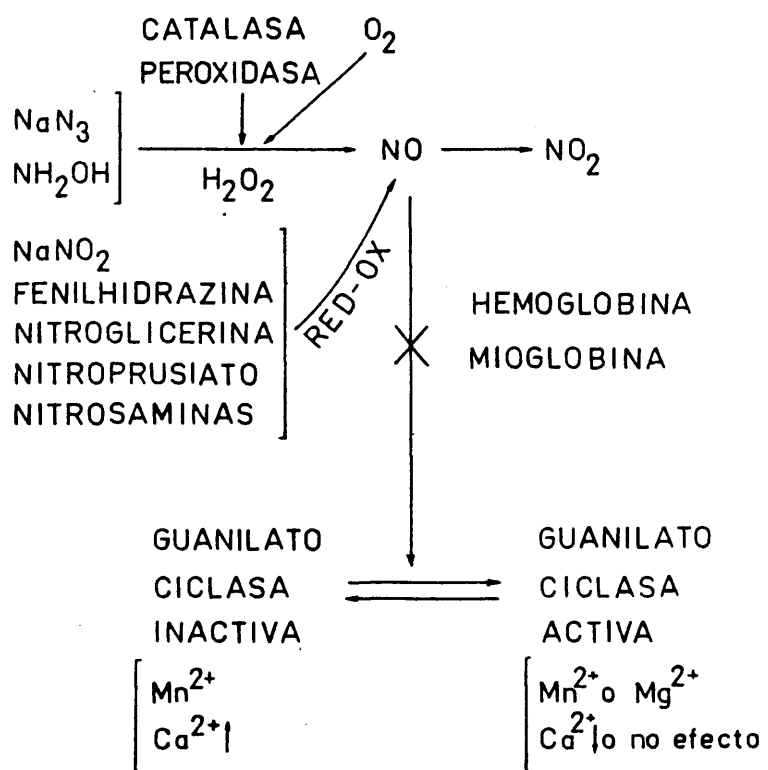


FIGURA 11. Esquema de activación de la guanilato ciclasa por NO (358).

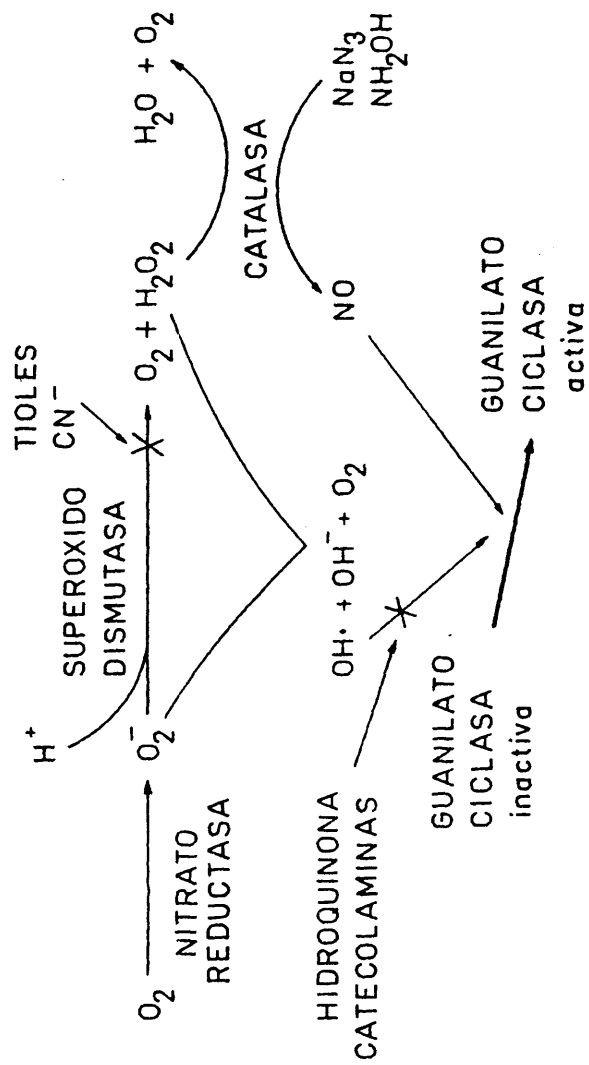


FIGURA 12. Activación de la guanilato ciclasa por radicales hidroxilo (358).

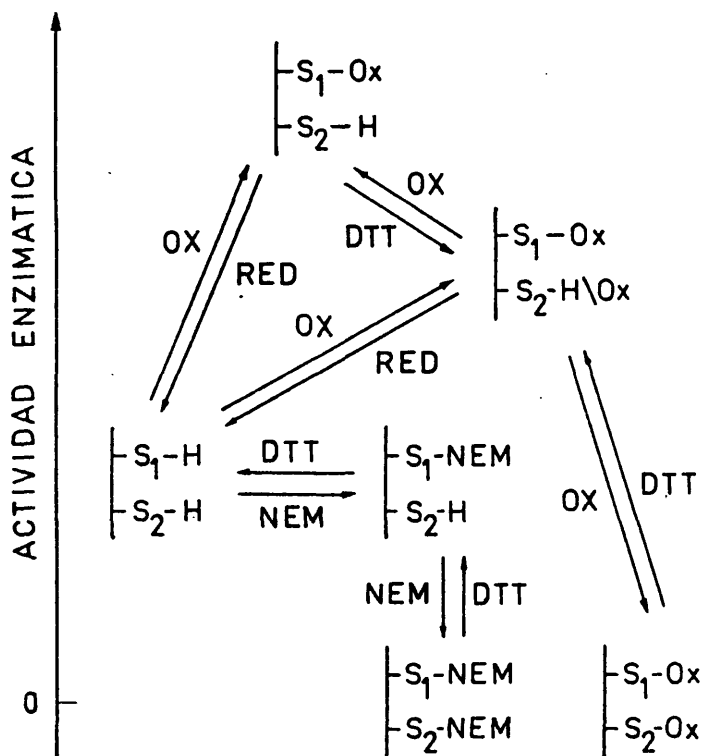


FIGURA 13. Regulación de la guanilato ciclasa a través de dos sitios susceptibles de oxidación.

do sitio probablemente implica la presencia de un grupo sulfhidrilo asociado con el componente catalítico, cuya oxidación supone la inactivación de la enzima, siendo ésta prevenida y revertida por DTT (334). Todo esto puede verse recogido en el esquema propuesto inicialmente por Böhme y col (359), que aquí aparece modificado en la fig 13.

Las investigaciones, sobre el tema, más recientes de Ignarro y Gruetter (361) indican que la activación por NO, nitroprusiato, NaNO_2 y nitroglicerina se realiza a través de compuestos nitrosotiólicos. Esto se fundamenta en que el efecto activador del nitrito y de la nitroglicerina se incrementa en presencia de ascorbato, cisteína, ditiotreitól y otros agentes reductores pero no en presencia de las formas oxidadas de éstos, encontrándose además que los nitrosotioles derivados de los mismos son capaces por sí solos de incrementar la actividad. Aunque el NO y el nitroprusiato no necesitan la presencia de agentes tiólicos, se supone que debido a su gran reactividad se pueden originar espontáneamente en el medio de incubación.

1.3.6. HORMONAS Y OTROS AGENTES MODULADORES

A causa de las similitudes de los sistemas de ambos nucleótidos, cAMP y cGMP, era de esperar que la guanilato ciclasa también estuviese sometida a control hormonal. Sin embargo, son muy pocas las investigaciones que describen una activación hormonal de la enzima en sistemas libres de células, e incluso en muchos casos las escasas descripciones realizadas no han podido ser confirmadas. La secretina (379) y la pancroozimina (380, 381) han sido descritas como activadores de la guanilato ciclasa en preparaciones de células rotas, sin embargo, Ichihava y col (382) han demostrado que el efecto activador se debe a la presencia de sales biliares en las preparaciones crudas de ambas enzi-

mas, resultando imposible la activación con enzimas purificadas o sintéticas.

Sin embargo, es obvio que un gran número de hormonas y drogas pueden aumentar los niveles de cGMP en sistemas "in vivo" o con cultivos celulares (334). Si esto es así y al mismo tiempo es imposible demostrar de forma directa algún efecto activador, resulta evidente que el mecanismo tiene que ser indirecto.

Schultz y col (383, 384) basándose en sus estudios en "ductus deferens" han demostrado que los incrementos de cGMP provocados por la acetilcolina y el K^+ son dependientes de la presencia de Ca^{2+} . En apoyo de la mediación del Ca^{2+} en el proceso de activación de la guanilato ciclasa existen muchas evidencias más (334), pero tal vez la más interesante la constituye el hecho de que el Ca^{2+} por sí solo, en presencia del ionóforo A23187 y en ausencia de otros posibles activadores, es capaz de provocar un incremento de los niveles de cGMP en varios tejidos (334).

El mecanismo por el cual el Ca^{2+} controla los niveles de cGMP es desconocido. Aunque como se ha comentado anteriormente el Ca^{2+} en determinadas condiciones puede activar la enzima soluble, es mucho más probable que el efecto se realice a través de una cadena de intermediarios donde el primer receptor podría ser alguna fosfolipasa- Ca^{2+} -dependiente o alguna proteasa de la membrana (334). El hecho de que en arteria umbilical los agentes que requieren la presencia extracelular del Ca^{2+} para incrementar los niveles de cGMP, también requieren la presencia de O_2 (356) apoya la teoría de que en el proceso de activación están implicados algunos otros componentes además del Ca^{2+} .

Un esquema complejo en el que se interrelaciona el Ca^{2+} y los nucleótidos cíclicos ha sido propuesto por Rasmussen y col (188) y puede verse en la fig 7.

1.3.7. REGULACION POR LIPIDOS

Glass y col (362, 363) encontraron que la guanilato ciclase de plaquetas podría ser activada por ácido araquidónico y algunos otros ácidos grasos estructuralmente relacionados. Se requería que los ácidos fueran insaturados de 20 a 22 átomos de carbono, tuvieran una estructura N-6 y un mínimo de tres dobles enlaces, para que la activación tuviera efecto. Los ácidos grasos saturados monoenoicos o dienoicos y las prostaglandinas E_1 , E_2 , y $F_{2\alpha}$ fueron totalmente inefectivas. El efecto activante del araquidónico se realiza exclusivamente sobre la V_{max} , sin afectar apenas a la K_m , y de una forma no cooperativa como indica el coeficiente de Hill obtenido de 0.98. Lo más impresionante de estos hallazgos fue que los requerimientos estructurales para la activación son los mismos que requieren los sustratos de la ácido graso ciclo-oxigenasa (prostaglandina sintetasa).

Por otra parte se vio que los agentes antiagregantes plaquetarios, como la aspirina y la indometacina, que bloquean la transformación del araquidónico en tromboxanos y prostaglandinas endoperóxido PGG_2 y PGH_2 , inhibiendo la ácido graso ciclooxigenasa (364), podían evitar la elevación de los niveles de cGMP (363). Era pues de esperar que estos metabolitos fueran los verdaderos activadores de la enzima. Así Glass y col (365) demostraron que la prostaglandina endoperóxido PGG_2 podía activar la guanilato ciclase de plaquetas. Una serie de estudios posteriores realizados por Goldber y col (357) con distintos ácidos grasos, prostaglandinas, prostaglandinas endoperóxidos e hidroperóxidos han confirmado los primeros hallazgos. Los ensayos han sido realizados con guanilato ciclase de células esplénicas y el resultado de los mismos puede darse en orden de potencia activadora: $PGG_2 > 15\text{-OOH-PGE}_2 > 13\text{-OOH-18:2} > 12\text{-OOH-20:4} > PGH_2 > 15\text{-OOH-20:4} > 12\text{-OH-20:4} > 13\text{-OH-18:2}$. En cuanto a los ácidos grasos el 20:4

y el 18:2 presentaron cierto efecto activador frente a la inefectividad absoluta del 18:1, 18:0 y ETY. La efectividad de la activación parece estar relacionada con la oxidación de algún grupo sulfhidrilo, ya que el DTT puede evitar y revertir el proceso en tanto que el $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ sólo puede evitarlo. De los estudios de activación conjunta por PGG_2 y DHA (ácido dehidroascórbico) este grupo concluye que existen al menos dos sitios de oxidación responsables de la activación, distintos del centro catalítico. A uno le denominan sitio de oxidación hidrofílico accesible para el DHA y al otro hidrofóbico accesible para el PGG_2 .

En cualquier caso, en la activación lipídica parece que subyace un fenómeno diferente a la oxidación, ya que los efectos de los ácidos grasos antes expuestos no pueden ser atribuidos fácilmente a fenómenos de oxidación (357, 362, 363). Además Wallach y Pastan (349) han señalado que la guanilato ciclasa particulada de fibroblastos puede ser estimulada por ácidos grasos saturados e insaturados. Los ácidos grasos saturados de 12 a 16 átomos de carbono fueron efectivos. Es de destacar que el efecto se observa mejor en presencia de Mg^{2+} , ya que altas concentraciones de Mn^{2+} , que elevan la actividad basal, oscurecen la activación.

Existe, sin embargo, ciertas dudas acerca de la especificidad de estos mecanismos, ya que los detergentes no iónicos Lubrol PX y Triton X-100 pueden producir también una activación (334). Ello parece estar a favor de una activación inespecífica por efecto surfactante por parte de los ácidos grasos. Ahora bien, esto no quiere decir que los ácidos grasos no puedan jugar un importante papel regulador en la actividad de la guanilato ciclasa.

Un efecto activador por parte de PS (Fosfatidilserina) (366), PI (Fosfatidilinositol) (334) y LPC (lisofosfatidilcolina)

(367) ha sido así mismo puesto de manifiesto. Aunque en el último caso los efectos de la lisolecitina fueron indistinguibles de los observados con detergentes no iónicos, se dio la circunstancia de que al mismo tiempo se provocaba un efecto inhibitor sobre la adenilato ciclasa, lo que se ha interpretado en favor de un posible papel coordinador de los lípidos en la regulación de ambas ciclasas. En relación con estos hechos también se ha observado que el tratamiento con Fosfolipasa A ó C activa la guanilato ciclasa (368-371) en tanto que los mismos tratamientos inactivan la adenilato ciclasa (232, 236, 237).

Un componente que activa la guanilato ciclasa y parece estar implicado en la regulación del metabolismo lipídico es el factor FR (feedback regulator) descubierto por Ho y Sutherland (372). Este factor estable al calor se libera al medio durante la incubación de adipocitos con agentes lipolíticos y aunque no ha sido caracterizado, sus efectos y propiedades son muy similares a las de los ácidos grasos libres (373). Los efectos activadores sobre la guanilato ciclasa han sido comprobados tanto con células intactas (374) como con fracciones particuladas libres de células (375).

La enterotoxina de E. coli, termicamente estable, conocida como enterotoxina ST, que es responsable de los procesos diarreicos de algunas enfermedades (377), se comporta como un activador, tanto "in vivo" como "in vitro" de la guanilato ciclasa de membranas de microvellosidades intestinales de rata (376, 377). Los dos grupos que han trabajado en este campo, sugieren que el cGMP puede ser el responsable del aumento de la secrección intestinal provocada por la enterotoxina. Además se cree que la ST puede actuar por un mecanismo similar al de los ácidos grasos, ya que el Mn^{2+} y el Lubrol PX impiden la activación de la guanilato ciclasa por enterotoxina igual que impiden estos mismos agen

tes la activación por ácidos grasos de la enzima de fibroblastos (349).

El estudio de la actividad de guanilato ciclasa frente a la temperatura según los gráficos de Arrhenius pone de manifiesto la existencia de un cambio brusco en la actividad de la enzima particulada de microvellosidades intestinales de rata a una temperatura de $30 \pm 1^{\circ}\text{C}$ (378). Este punto de inflexión coincide con el de otras enzimas y con la transición termotrópica de los lípidos de esas membranas. La inflexión desaparece en presencia de Lubrol WX, potente activador de la enzima. Esto sugiere que el entorno lipídico juega un papel esencial en la modulación de la actividad.

1.3.8. cGMP Y PROLIFERACION

Ultimamente se ha prestado una considerable atención a los mecanismos por los cuales los agentes que inducen el crecimiento, provocan una proliferación celular a través de los que parecen ser exclusivamente procesos a nivel de superficie celular (385). Uno de los estudios realizados con lectinas mitógenas sugiere que el cGMP representa una señal positiva para la inducción de la proliferación en linfocitos (386) y el cAMP actúa como una señal negativa. Por otra parte, los experimentos de inducción de proliferación con insulina y suero en fibroblastos sugieren que una disminución de los niveles de cAMP representa una señal positiva para el crecimiento celular (301).

Los estudios de Coffey y col (388) aportan datos importantes acerca de la relación existente entre el Ca^{2+} y el cGMP y sugieren que ambos son componentes básicos de una señal que conduce a la activación nuclear y la división celular (387).

Algunos autores han observado un incremento de los niveles de cGMP como respuesta a una estimulación mitogénica (334,

388), pero otros no han observado cambio alguno (309, 389-391). Por otra parte, agentes tales como acetilcolina e imidazol que elevan el contenido en cGMP, sólo estimulan la proliferación en presencia de agentes mitogénicos como con A o fitohemaglutinina (334). De esto se deduce que los niveles de cGMP no son los determinantes del proceso de proliferación, sino que se incrementan como consecuencia del mismo.

Teniendo en cuenta los efectos provocados por el cGMP exógeno (334) y la asociación observada con la acción mitogénica de otras sustancias Goldberg y Haddox (334) sugieren que este nucleótido puede representar un papel de modulador positivo actuando en paralelo o en secuencia con otros cambios metabólicos que se requieren para la acción mitógena.

1.4. ADENILATO Y GUANILATO CICLASA EN INSECTOS

Desde que en 1962 Sutherland y col (4) determinaran la presencia de adenilato ciclasa en homogeneizado totales de larva de mosca hasta nuestros días, no pasan de algunas decenas el número de publicaciones que han aparecido haciendo referencia tanto a la adenilato como a la guanilato ciclasa de los insectos (tablas 10 y 11).

La adenilato ciclasa en insectos es particulada y presenta dentro de las pocas facetas estudiadas muchas analogías con la enzima de mamífero siendo su regulación hormonal característica lo que fundamentalmente las diferencia. Bodnaryk (405) describe las características de la adenilato ciclasa de cerebro de insecto sensible a octopamina de la siguiente forma: (i) El pH óptimo, la relación ATP:Mg^{2+} óptima, la K_m para el ATP, la especificidad de metales, los efectos del NaF, GTP y GppNHp son similares a los de la adenilato ciclasa de mamífero sensible a catecolaminas; (ii) el EGTA estimula la actividad basal y la estimulada por octopamina, en tanto que en cerebro de mamífero inhibe la actividad basal pero no la estimulada por catecolaminas; (iii) Junto con GTP se necesita un factor citosólico para activar la fracción particulada; (iv) el antagonista α -adrenérgico, fentolamina, y el antagonista histaminérgico y serotoninérgico ciproheptadina son potentes antagonistas de la octopamina (187, 404, 406); (v) la relación estructura-actividad para la estimulación por octopamina es diferente a la que necesitaría un receptor dopaminérgico o β -adrenérgico (406).

A parte de la existencia de un receptor específico octopaminérgico es muy probable que al menos otros dos tipos más estén presentes en los insectos, uno dopaminérgico (187, 404, 405, 409-411) y otro serotoninérgico (187, 188, 401-403, 408).

Periplaneta americana	Hemocitos	SI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	412
Phormia regina	Quimiorreceptores	SI	ND	ND	ND	ND	ND	ND	413
Hyalophora gloveri	Epidermis de ala	SI	ND	ND	ND	ND	ND	ECDISONA ⊕	313
								OCTOPAMINA ⊕	
								DOPAMINA ⊕	404
Mamestra configurata	Cerebro	SI	SI	⊖	⊕	⊕	⊕	NORADRENALINA ⊕	405
								SEROTONINA (SE)	406
								HISTAMINA (SE)	
Calliphora erythrocephala	Glándula salivar	SI	ND	⊖	⊕	⊕	ND	SEROTONINA ⊕	188 401 402 403

ND: No determinado; SE: Sin efecto; ⊕ : Estimulación; ⊖ : Inhibición

TABLA 11: Propiedades de la guanilato ciclasa en insectos.

<u>INSECTO</u>	<u>TEJIDO</u>	<u>Me²⁺-GTP</u>		<u>MODULACION</u>		
		<u>Mn²⁺</u>	<u>Mg²⁺</u>	<u>TRITON X-100</u>	<u>NaN₃</u>	<u>REF.</u>
Acheta domesticus	Glándula accesoria reproductora	SI	NO	ND	SI	324
Hyalophora cecropia	Cuerpo graso	SI	NO	SI	ND	399
Ceratitis capitata	Total	SI	ND	ND	ND	325

ND: No determinado

Resultan de gran interés los datos obtenidos por Morishima (396-398) en cuerpo graso de Bombyx mori acerca del papel del Ca^{2+} y de la adenosina sobre la adenilato ciclasa. El Ca^{2+} parece actuar como un activador a bajas concentraciones en presencia de un factor citosólico de características parecidas a las de la calmodulina de mamíferos (398). En cuanto a la adenosina se ha observado un efecto inhibitor marcadamente dependiente de metales divalentes de forma semejante a como ocurre en mamíferos cuando actúa vía sitio "P", sin que se descarte por ello la posibilidad de que los efectos vía sitio "R" puedan permanecer enmascarados (396). El papel que la adenosina puede jugar en insectos se desconoce, pero merece la pena resaltar a tal efecto el trabajo de Vedeckis y Gilman (414) los cuales han detectado una producción de elevadas cantidades de adenosina en cerebro y glándula protorácica de Manduca sexta.

La guanilato ciclasa ha sido escasamente estudiada y prácticamente no se pueden sacar conclusiones acerca de la regulación de la enzima, si bien, es cierto que en lo que se refiere a las características hasta el momento determinadas se asemeja mucho a las enzimas de mamíferos.

Aparte de las evidencias directas de la presencia de estas enzimas en insectos existen otro tipo de datos mediante los cuales se relacionan los niveles de los nucleótidos cíclicos con parámetros fisiológicos de su metabolismo y desarrollo. Estos datos aportan evidencia indirecta sobre la posible regulación de la enzima y por lo tanto merece la pena hacer una reseña de los mismos.

El cAMP se ha determinado a lo largo del desarrollo de varios insectos: Ceratitis capitata (392, 415, 416), Hyalophora cecropia (417), Mamestra configurata (418), Oncopeltus fasciatus (419) y Manduca sexta (420). Los niveles del nucleótido se

han intentado correlacionar con los distintos procesos fisiológicos acaecidos durante el mismo, pero, en general, las relaciones son difíciles de establecer, ya que son muchos los mecanismos que pueden hacer fluctuar los niveles de cAMP.

La relación entre la β -ecdisona y los niveles de cAMP ha sido estudiada por varios investigadores (393, 395, 414, 415, 421, 429). Sin embargo, todos los datos son confusos y en buena medida contradictorios. Los planteamientos más acertados parecen ser los de Seligman y col (422), quienes después de demostrar que el cAMP puede ser el segundo mensajero de la hormona PTF (423) han propuesto que la ecdisona media la liberación de dicha hormona esquema que queda reflejado en la fig 14. Por otra parte los datos aportados por Vedeckis y col (420) parecen indicar que a su vez la secreción de β -ecdisona podría estar mediada por un aumento de los niveles de cAMP en la glándula protorácica provocada por la estimulación de la misma por la hormona PBH ("Prothoraciotropic brain hormone").

De todas formas no hemos de olvidar que la interpretación de los niveles de cAMP es difícil, ya que las variaciones en la actividad de enzimas tales como la PDE pueden alterar significativamente dichos niveles y así Everson y Feir (419) proponen que la hormona JH (hormona juvenil) puede disminuir la concentración de cAMP activando la PDE en Oncopeltus fasciatus.

En lo que se refiere a los niveles de cGMP han sido determinados en Ceratitis capitata (416), Acheta domesticus (9, 425, 429), Mamestra configurata (418, 427) y varios ortópteros (425).

De especial interés son los estudios de Spruill y col (428) en cromosomas politénicos de Drosophila melanogaster, demostrando una asociación del cGMP con los mismos, sugiriendo una estrecha relación entre el nucleótido y varios procesos asocia-

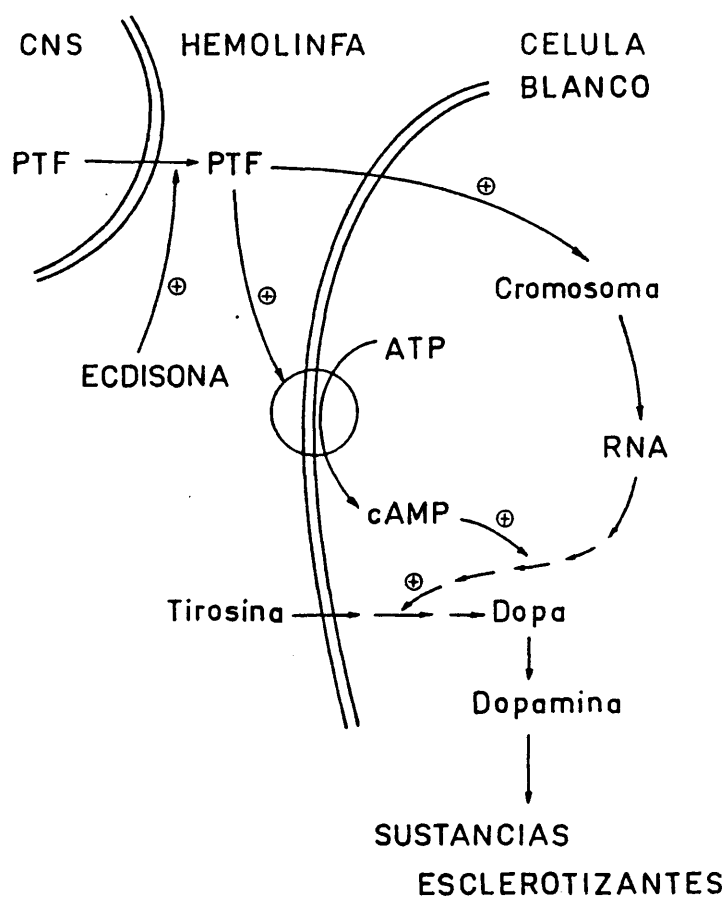


FIGURA 14. Relación entre la ecdisona y los niveles de cAMP (423).

dos con la expresión genética.

Los experimentos de Delinger y Wingard (426) atribuyen un papel relevante al cGMP en la iniciación del desarrollo del adulto en la mosca Sarcophaga crassipalpis.

De los datos aquí apuntados y otros descritos acerca de las demás enzimas y proteínas (cAMP dep.-proteína quinasa; cGMP dep.-proteína quinasa, fosfodiesterasas y proteínas que unen cAMP) implicadas en el metabolismo de los nucleótidos cíclicos en insectos, se desprende que, al igual que en los mamíferos, es tos nucleótidos no se limitan a ejercer su misión reguladora en un aspecto concreto del metabolismo o en un momento determinado de su desarrollo, sino que su papel regulador se extiende a numerosas áreas y a todo el periodo de vida del insecto constituyendo un conjunto homeostático aún poco comprendido.

9/2

2. MATERIALES Y METODOS

2.1. MATERIALES

1º. SOPORTES CROMATOGRAFICOS

Sephadex G-100 (40-120 μ) (Pharmacia)
Sephadex G-200 (40-120 μ) (Pharmacia)
Blue-Sepharosa-CL-6B (Pharmacia)
Ultrogel AcA 22 (60-140 μ) (LKB)
Biogel HTP (BIO-RAD)
Bio-Beads-SM-2 (20-50 mallas) (BIO-RAD)
Dowex AG 50W x 4 (H^+) (200-400 mallas) (BIO-RAD)
DEAE-celulosa (Sigma)
Silicagel G (Merck)
Alúmina neutra 90 activa (G.A.-I) (Merck)
Alúmina neutra W-200 (G.A. Super I) (Woelm)
Celulosa MN 300 (Düren)

2º. FILTROS

Whatman GF/C (Whatman)
Millipore HAWP (Millipore)

3º. ENZIMAS Y PROTEINAS

Piruvato quinasa (músculo de conejo) (115 u/mg) (Sigma)
Proteína quinasa (corazón de bovino) (2000 u/mg) (Sigma)
Creatina fosfoquinasa (músculo de conejo) (160 u/mg) (Sigma)
Tripsina (pancreas bovino) (33 u/mg) (Boehringer)
Fosfolipasa A₂ (pancreas porcino) (600 u/mg) (Boehringer)
Inhibidor de tripsina (soja) (1 mg inhibe 1.5 mg de tripsina)
(Boehringer)
Histona (Tipo IIA) (timo de ternera) (Sigma)
Albumina (fracción V) (suero bovino) (Sigma)
Protamina (Sigma)

Tiroglobulina (tiroides bovino) (Sigma)
Glutamato deshidrogenasa (hígado bovino) (Sigma)
Catalasa (bovino) (sigma)
 α -Amilasa (Bacillus subtilis) (Sigma)

4º. ISOTOPOS

(8-³H)cAMP (20-30 Ci/mmol) (Amersham)
(8-³H)cGMP (10-30 Ci/mmol) (Amersham)
³²P-ortofosfato (30-100 Ci/mg) (Amersham)
(α -³²P)ATP (80-250 Ci/mmol) (Amersham)
(α -³²P)GTP (80-250 Ci/mmol) (Amersham)
(γ -³²P)ATP (5000 Ci/mmol) (Amersham)

5º. DETERGENTES

Triton X-100 (Merck)
Lubrol PX (Sigma)
Dodecilsulfato sódico (SDS) (Sigma)

6º. REACTIVOS DE CENTELLEO

PPO (Sigma)
POPOP (Sigma)
Naftaleno (Merck)
Dioxano (Carlo Erba)
Tolueno (Carlo Erba)

7º. LIPIDOS

Trioleina (Fluka)
Fosfatidilcolina (Sigma)
Acido oléico (Sigma)

8º. OTROS PRODUCTOS Y REACTIVOS

Nucleotidos (Sigma)
Nucleosidos (Sigma)
Bases púricas (Sigma)
Bases pirimidínicas (Sigma)
Teofilina (Merck)
GppNHp (Sigma) (Boehringer)
Fosfato de creatina (Sigma)
Fosfoenolpiruvato (Sigma)
Octopamina (Sigma)
Noradrenalina (Sigma)
Adrenalina (Sigma)
Serotonina (Sigma)
Dopamina (Sigma)
Tiramina (Sigma)
Feniletilamina (Merck)
Isoproterenol (Sigma)
Propanolol (Sigma)
Clorpromacina (Sigma)
Fentolamina (Ciba-Geigy)
Ciproheptadina (Merck)
Yohimbina (Merck)
Trizma-HCl (Sigma)
Trizma-Base (Sigma)
Sacarosa (Sigma)
2-Mercaptoetanol (Merck)
Ditiotreitól (Sigma)
Reactivo Folin-Ciocalteu (Merck)
PEG-20 000 (Serva)
Azul dextrano (Sigma)
El resto de los productos y reactivos utilizados son de grado analítico.

2.2. MATERIAL BIOLOGICO

El cultivo del díptero Ceratitis capitata (Wiedemann), utilizado a lo largo de toda la experimentación se ha realizado en el Instituto Nacional de Investigaciones Agronómicas (El Encín. Alcalá de Henares), bajo condiciones controladas de dieta, temperatura y humedad (430).

Los insectos se limpian cuidadosamente según su estado de desarrollo, antes de proceder a su utilización inmediata o a su conservación a -70°C , hasta el momento de su empleo.

2.3. OBTENCION DE CABEZAS DEL INSECTO ADULTO

El procedimiento utilizado para este fin ha surgido como resultado de ligeras modificaciones del método puesto a punto con anterioridad en nuestro laboratorio (431).

El adulto farato se transfiere pocas horas antes de la emergencia, en recipientes de material plástico, al interior de jaulas especialmente diseñadas para el desarrollo de los adultos. A las pocas horas de producirse las primeras emergencias y cuando el número de adultos es considerable se procede al traslado de las jaulas a una cámara fría ($4-6^{\circ}\text{C}$). A los 10 min se pueden retirar los recipientes plásticos que contienen los restos del pupario y recoger los adultos que permanecen en la jaula. Inmediatamente se procede a su congelación en aire líquido para su utilización posterior.

Para la separación de las cabezas del resto del individuo se introducen 100 g de insecto adulto congelado en un recipiente de cristal de 1 l de capacidad, junto con elementos cúbicos de goma de aproximadamente 0.5 cm de arista, todo ello mantenido en aire líquido durante 5 min, asegurándose que la conge-

lación es absoluta. Se agita entonces el recipiente de vidrio vigorosamente durante otros 5 min, vertiéndose posteriormente su contenido en un sistema de tamices de malla controlada y decreciente, de tal forma que con una ligera agitación durante 20 s pueden obtenerse seleccionadas en el tamiz adecuado aproximadamente 10 g de cabezas con despreciable contaminación del resto de los elementos que constituyen el insecto adulto. Las cabezas así obtenidas son pesadas y homogeneizadas inmediatamente.

Este procedimiento permite obtener cantidades suficientes de material para los ensayos en un tiempo que oscila entre los 10 y los 15 min sin que el tejido llegue en ningún momento a descongelarse antes de la homogeneización y sin que sufra por ello perturbación inadecuada alguna.

2.4. PREPARACIONES DE MEMBRANA

El método general seguido para la obtención de las preparaciones de membrana altamente enriquecidas en actividad de adenilato ciclase, se puede aplicar con ligeras modificaciones de manipulación a los distintos estadios del insecto con resultados satisfactorios; por ello nos ceñiremos a continuación a la descripción de las operaciones efectuadas con las cabezas del insecto adulto, por ser éste el material más utilizado en nuestros estudios.

4 g. de cabezas de adulto se homogeneizan en 40 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C), conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 5 mM. La homogeneización se lleva a cabo con un dispositivo Potter-Elvehjem equipado con un émbolo de teflón, mediante 10 emboladas a 2 000 rpm a 4°C. El homogeneizado se centrifuga a 1 000 g durante 5 min. El sedimento se elimina y el sobrenadante se centrifuga nuevamente a 2 000 g durante 15 min. Se recentrifuga entonces el sobrenadante a 37 000 g durante 15 min y el sedimento

to se resuspende en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C), conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 1 mM. La suspensión se aplica en un gradiente discontinuo de sacarosa formado por 15 ml de sacarosa 1.0 M y 15 ml de sacarosa 1.5 M preparadas en el mismo tampón que la suspensión y se centrifuga a 25 000 g durante 45 min. La interfase de sacarosa 0-1 M con alta actividad de adenilato ciclasa se extrae con una jeringa o pipeta pasteur y se lava dos veces con 45 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C), conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 1 mM por centrifugación a 37 000 g durante 15 min. El sedimento, finalmente, se lava con 45 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (37°C), conteniendo 2-mercaptoetanol 10 mM para obtener una concentración 1-2 mg de proteína por ml y se almacena a -70°C. La preparación de membranas así obtenida se distribuye siempre en alícuotas de volumen idóneo según las necesidades del ensayo a fin de que no sufran descongelación hasta el momento de su empleo, conservándose de esta forma durante periodos de 2-4 semanas sin que se aprecie modificación de su actividad.

Todas las operaciones del método se realizan a temperatura controlada de 0-4°C;

Las centrifugaciones se llevan a cabo en una centrífuga refrigerada Sorvall RC2-B equipada con el rotor SS-34, salvo para la centrifugación en gradiente discontinuo en la que se emplea el rotor flotante HB-4 para evitar distorsiones del gradiente.

2.5. DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS

2.5.1. ADENILATO CICLASA

2.5.1.1. ENSAYO CROMATOGRAFICO

Este ensayo ha sido realizado conforme al método descrito por Salomon y col (15) con pequeñas modificaciones. La mezcla de incubación estandar contiene tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (37 °C), 2-mercaptoetanol 10 mM, 0.05 mM ATP (10 nmol conteniendo $5-6 \times 10^5$ cpm (α - 32 P)ATP), 0.75 mM cAMP (150 nmol), $\text{Mg}^{2+}\text{Cl}_2$ (10 mM cuando se trata de MgCl_2 y 1 mM cuando se trata de MnCl_2 o CoCl_2) el resto de los cofactores y la enzima (30 μ g), en un volumen final de 200 μ l. La reacción se inicia en la mayoría de los casos por adición del preparado enzimático de membrana, si bien, en determinadas ocasiones es el ATP el que se utiliza a tal fin. La incubación se lleva a cabo durante 10 min a 37 °C. La reacción se detiene por la adición de 0.5 ml de ZnSO_4 120 mM frío, introduciéndose inmediatamente las muestras en un baño de hielo y añadiendo con rapidez 0.5 ml de Na_2CO_3 120 mM. A continuación se adicionan 25 μ l de (8 - ^3H)cAMP (2×10^4 cpm) y se diluye la mezcla con 0.5 ml de agua destilada. La mezcla se centrifuga a 4 500 g durante 10 min, en una centrifuga de mesa convencional (Wifug Labor) y el sobrenadante se aplica en una columna de Dowex 50W x 4 (200-400 mallas) (H^+) de 0.6 x 8.0 cm y se lava con 3.0 ml de agua. A continuación se añaden otros 3.5 ml de agua y el eluido se recoge directamente sobre una columna de alúmina neutra (aproximadamente 1 g) 0.6 x 3.0 cm, previamente equilibrada con tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7.2 (25 °C). El eluido inicial se descarta y a continuación se añaden 3 ml del mismo tampón de equilibrio, recogiendo éstos sobre un vial de centelleo al que se adicionan 15 ml de líquido de centelleo dioxano-naftaleno o tT21.

La radiactividad recuperada oscila entre 60-80%. Los ensayos blancos obtenidos en ausencia de enzima, o de catión divalente o bien por calentamiento a ebullición del preparado enzimático, no suponen en ningún caso más de 20 cpm. Los ensayos realizados por duplicado o triplicado arrojan variaciones no superiores al 5%. Los valores se expresan mediante la media de las determinaciones efectuadas.

2.5.1.2. ENSAYO POR TECNICA DE COMPETENCIA DE UNION ESPECIFICA

El ensayo se basa en la capacidad de ciertas proteínas de unir específicamente cAMP. Si se hace competir cAMP marcado con cAMP no marcado podremos establecer mediante curvas estándar la cantidad de cAMP no marcado que existe en la muestra problema.

El método experimental se basa en el procedimiento que Gilman (433) utiliza para la valoración de cAMP. En él se han introducido una serie de modificaciones para acoplar el ensayo a la valoración de adenilato ciclasa. Los cambios se han efectuado según el método de Albano y col (434) y los resultados experimentales obtenidos en nuestro laboratorio.

La mezcla de incubación tiene la misma composición que en el ensayo anterior salvo que en este caso no se utiliza (α - ^{32}P) ATP y la concentración final de ATP es de 0.1-0.2 mM.

La incubación se lleva a cabo a 37°C durante 10 min, deteniéndose la reacción mediante calentamiento a ebullición durante 1 min. A continuación se diluye la muestra con 0.5 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C), que contiene 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 5 mM. Se centrifuga 10 min a 4 500 rpm, en una centrifuga de mesa Wifug; se toma una alícuota del sobrenadante de 25 μl y se valora frente al receptor de cAMP.

La proteína que se utiliza se obtiene del propio insecto mediante las operaciones que se describen más adelante y el ti

po de ensayo es análogo al descrito por Rosen y col (435).

En un volumen final de 100 μ l, se incuba por espacio de 45 min en baño de hielo, una mezcla que contiene tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C), 2-mercaptoetanol 10 mM, EDTA 5 mM, (8-³H) cAMP (1 pmol: 3×10^4 cpm), la alícuota del ensayo de adenilato ciclase y el preparado de proteína receptora de cAMP. La reacción se inicia mediante la adición de este último y se detiene con 1.0 ml de solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado y frío. La mezcla se filtra a vacío en filtros de fibra de vidrio Whatman GF/C humedecidos con la misma disolución de detención y se lava con 6 ml de solución de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ saturado. El filtro se lleva a un vial de centelleo de 3 ml de capacidad y se cuenta con el líquido de centelleo dioxano-naftaleno.

Las curvas estándar se obtienen introduciendo en el ensayo cantidades conocidas de cAMP no marcado y una alícuota del ensayo blanco de adenilato ciclase que no contiene cAMP, previa desactivación térmica del preparado de membranas.

La linearización de los resultados se consigue representando según el método de Brown y col (436), el $\log (R_x - R_o)$ vs $\log P_x$, donde P_x representa los pmoles de cAMP frío añadidos, R_x es la razón cAMP libre/unido para una adición dada de cAMP frío y R_o es la razón de cAMP libre/unido cuando no se añade nucleotido frío.

2.5.2. GUANILATO CICLASE

El método está basado originalmente en el procedimiento que Salomon y col (15) utilizan para la separación del cAMP, que a su vez se fundamenta en los métodos de White y Zenser (437) y de Krishna y Birnbaumer (438).

La idea parte del hecho demostrado por Schultz y col (439) de que el cGMP también podía separarse de otros nucleotidos análogos mediante la misma resina que utilizaban Krishna y

col, en tanto que por otra parte White y col habían probado ya su método para el cGMP.

Se añadió a esto, una idea original de Garbers y col (342) que detienen la reacción por la formación "in situ" de ZnCO_3 lo cual supone al mismo tiempo una primera purificación, como lo demuestran los estudios de Chan y Lin (440). Se utilizó Na_2CO_3 y ZnSO_4 en lugar de ZnAc_2 , el cual se comprobó que interfería en las separaciones posteriores.

La incubación se realiza en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (30°C) y contiene 2-mercaptoetanol 10 mM, GTP 0.33 mM, cGMP 1 mM, MnCl_2 5 mM, teofilina 10 mM, NaN_3 10 mM y (α - ^{32}P)GTP (1×10^6 cpm) en un volumen final de 150 μl . La reacción se inicia por adición del preparado enzimático y se mantiene a 30°C durante 15 min. En ese momento la reacción se detiene por la adición de 1.0 ml de ZnSO_4 0.06 M frío, llevándose a continuación los tubos a un baño de hielo donde se añaden 0.5 ml de Na_2CO_3 0.12 M. Seguidamente se adicionan 25 μl de (8- ^3H)cGMP (3×10^4 cpm) y se centrifuga durante 10 min en una centrifuga convencional de mesa Wifug.

El sobrenadante se pasa a una columna de Dowex 50W x 4 (H^+) de 0.6 x 12.0 cm. Se eluye con 2.5 ml de agua y el eluido se recoge sobre una columna de alúmina neutra (aproximadamente 1 g) de 0.6 x 3.0 cm, equilibrada con tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7.2 (25°C). El eluido se desecha y a continuación se añaden 3.5 ml del tampón de equilibrado, los cuales se recogen sobre un vial que contiene 15 ml de líquido de centelleo, dioxano-naftale no o tT21.

Los datos de recuperación, blanco y desviaciones del ensayo son similares a los descritos en el ensayo de adenilato ciclase.

2.5.3. PROTEINA RECEPTORA DE cAMP

Este ensayo se basa en el método que ya apuntamos anteriormente de Rosen y col (435) con algunas modificaciones.

La incubación se realiza en un volumen final de 100 μ l en tampón acético-acetato sódico 100 mM, pH 4.5 que contiene 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 5 mM, junto con (8-³H)cAMP ($3-6 \times 10^4$ cpm). La reacción se inicia por adición de la proteína a ensayar y se desarrolla durante 45 min a 0-4°C en baño de hielo. La detención se efectúa por adición de 1 ml de solución de (NH₄)₂SO₄ saturado y frío. Se filtra a vacío el contenido del tubo sobre un filtro de fibra de vidrio Whatman GF/C previamente humedecido con solución de (NH₄)₂SO₄ saturado y se lava con 6 ml de la misma solución.

El filtro se introduce en un vial de 3 ml y se cuenta con líquido de centelleo dioxano-naftaleno.

Conocida la actividad específica del isótopo utilizado y la eficacia del conteo se pueden calcular los pmoles de cAMP unidos a la proteína.

2.5.4. FOSFOPROTEINA-FOSFATASA

El ensayo se realizó por el procedimiento puesto a punto en nuestro laboratorio (444), basado a su vez en el método de Khandelwal y col (445), siendo imprescindible en una primera etapa la obtención del sustrato marcado.

La fosfohistona marcada con ³²P se preparó a partir de histona de timo de ternera, utilizando (γ -³²P)ATP (Act. esp. 5 000 Ci/mmol), de acuerdo con el método de Maeno y Greengard (446) con ligeras modificaciones. Cada mililitro de mezcla de incubación contiene tampón acetato sódico pH 6.4 (10 μ moles), 100 μ g de proteína quinasa de corazón de bovino, 1 mg de histona, 10 μ moles de acetato magnésico, 10 nmoles de fluoruro sódico, 2 μ moles de teofilina, 5 nmoles de cAMP y 5 nmoles de (γ -³²P)ATP ($5-10 \times 10^6$

cpm. La reacción se lleva a cabo durante 45 min a 30°C y se detiene por adición de 0.25 ml de TCA al 100% por cada mililitro de mezcla. El precipitado final se solubiliza en agua destilada y se dializa frente a agua durante 34 hr con una membrana Visking Tubing 18/32 (The Scientific Instrument Centre LTD) con un tamaño de poro impermeable a sustancias de peso molecular superior a 6 000 D.

La recuperación de histona al final del proceso varía entre el 60 y 80% y la incorporación de ^{32}P en la histona es aproximadamente del 35%.

La fosfohistona así preparada se puede conservar en solución a -20°C durante al menos una semana sin que se observen alteraciones significativas en su composición.

La reacción para el ensayo enzimático de actividad fosfoproteinafosfatasa se realiza en un volumen final de 200 μl conteniendo tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.4 (37°C), ditioneitol 0.5 mM, KCl 0.1 M, MgCl_2 10 mM, 25-50 g de ^{32}P -Histona ($5-10 \times 10^5$ cpm) y el extracto enzimático que se quiere ensayar. La reacción se inicia normalmente por la adición de la preparación enzimática y se desarrolla a 37°C durante 10 min. Se detiene por la adición de 0.5 ml de TCA al 30% y 0.2 ml de albúmina de suero al 63%. Después de mantener los tubos en baño de hielo durante 10 min, se centrifugan en una centrifuga de mesa convencional Wifug, durante 10 min a 1 500 g y una alícuota de 0.5 ml del sobrenadante se cuenta en un vial de centelleo con 2.5 ml de dioxano-naftaleno.

2.5.5. PROTEINA QUINASA

Este ensayo se basa en la propiedad catalítica de estas enzimas de transferir el fosfato del ATP a un resto de serina o treonina de determinadas proteínas.

El método conlleva marcar radiativamente el fosfato del ATP con ^{32}P y determinar la radiactividad incorporada en una pro-

teína específica, generalmente histona, como resultado del proceso catalítico.

El medio de incubación contiene tampón fosfato potásico 10 mM, 1 nmol (γ - ^{32}P)ATP ($2-3 \times 10^5$ cpm), 200 μg de histona de ti^mo de ternera y el preparado enzimático, todo ello en un volumen final de 200 μl . Si se ensaya la actividad enzimática de proteína quinasas dependientes de nucleótidos cíclicos, es necesario incorporar estos en el medio de incubación, siendo la concentración de cAMP $5 \times 10^{-6}\text{M}$ y la de cGMP 10^{-5}M , si bien en este último caso es conveniente elevar la concentración de acetato magnésico hasta 100 mM.

La reacción se inicia por la adición del preparado enzimático y se deja transcurrir durante 5 min a 37°C . Se detiene, entonces, mediante 0.6 ml de TCA 25% frío y los tubos se llevan inmediatamente a un baño de hielo para que se complete la precipitación de las proteínas del medio de incubación.

En algunas circunstancias, cuando en lugar de histona se utiliza protamina es necesario añadir en el momento de la detención 0.2 ml de albúmina (10 mg/ml) para que la precipitación del sustrato sea total.

Para determinar la radiactividad incorporada en el precipitado, se filtra la suspensión a vacío por un filtro de vidrio Whatman GF/C, de 2.5 cm de diámetro, humedecido con TCA 18%. A continuación, tanto el tubo de ensayo como el filtro sobre el que se ha depositado la muestra se lavan con 6 ml de TCA 18%.

El filtro, una vez seco, se introduce en un vial junto con 3 ml de líquido de centelleo de tolueno y se determina la cantidad de ^{32}P presente en el vial.

El fondo del ensayo se determina mediante la desnaturación previa del preparado enzimático por ebullición del mismo o por detención de la reacción a tiempo 0.

La desviación en ensayos realizados por triplicado no excede nunca de un 5% del valor medio.

2.5.6. ACTIVIDAD ATPasica

El ensayo utiliza (γ - ^{32}P)ATP como sustrato y la cuantificación de la actividad ATPasica se hace determinando la radiactividad del ^{32}P liberado.

El medio de incubación contiene tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (37°C), 2-mercaptoetanol 10 mM, 100 nmoles de (γ - ^{32}P)ATP (15×10^4 cpm), MgCl_2 3 mM, NaCl 140 mM, KCl 20 mM, junto con el extracto enzimático a ensayar en un volumen total de 75 μl . Cuando se trata de determinar la posible influencia de la actividad ATPasica, en el ensayo de adenilato ciclasa fue preciso sustituir el MgCl_2 , NaCl y KCl por los cofactores utilizados en el ensayo en cuestión, ya que de otra forma, las condiciones no serían comparables.

La reacción se desarrolla a 37°C durante 8 min. La detención se efectúa por adición de 0.9 ml de una solución "quenching" (10 ml de molibdato amónico 2.5%, 12,5 ml H_2O). A continuación se añaden 10 μl de H_2SO_4 10 N y 1 ml de benceno-isobutanol (1:1). Se agita durante 15 s y se enfría en baño de hielo. Se centrifuga a 4 500 rpm en una centrifuga de mesa Wifug. Una alícuota de 0.5 ml de la fase orgánica superior se lleva a un vial junto con 2.5 ml de líquido de centelleo de dioxano-naftaleno y se determina la radiactividad del ^{32}P que contiene.

Es necesario establecer una curva de calibrado, un ensayo blanco sin proteína y otro con proteína sin cofactores. La curva de calibrado se realiza en las mismas condiciones de incubación salvo que en lugar del (γ - ^{32}P)ATP se ponen cantidades crecientes desde 1 nmol a 20 nmoles de (^{32}P) Na_3PO_4 con una actividad específica de 1900 cpm/nmol.

La recuperación del fosfato liberado es de aproximadamente un 45% en el intervalo antes mencionado.

Si se trata de ensayar la actividad ATPasica ($\text{Na}^+ - \text{K}^+$) dependiente, es recomendable incluir un ensayo que contenga ouabaina 1 mM, ya que de esta forma se puede controlar la cantidad exacta de ^{32}P liberado por esta actividad, considerando ese ensayo como control.

Este ensayo presenta gran dificultad de interpretación de los resultados, ya que como lo que se determina es la liberación del fosfato del ATP, ésta puede producirse por mediación de otros sistemas enzimáticos entre los que se incluye la propia adenilato ciclasa, la cual libera pirofosfato que puede ser hidrolizado a su vez por una pirofosfatasa. Es probable, además, que parte del pirofosfato como tal, pase a la fase orgánica. Por todo esto, el ensayo, salvo cuando se utilicen inhibidores específicos de los distintos tipos de actividades ATPasicas, debe considerarse exclusivamente desde un punto de vista orientativo.

2.6. TRATAMIENTO TERMICO

El ensayo se desarrolla en dos pasos, una preincubación en ausencia de ATP y una incubación en presencia del mismo.

El medio de preincubación básico contiene Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (37°C), 2-mercaptoetanol 10 mM, 150 nmoles de cAMP junto con la preparación enzimática con actividad de adenilato ciclasa (30-50 g de proteína). En este medio de preincubación se pueden incluir además, según los experimentos, 2 μmoles MgCl_2 , 200 nmoles MnCl_2 , 2 μmoles NaF, 20 nmoles GTP y 20 nmoles GppNHp, ya sea individualmente o debidamente combinados. La preincubación se lleva a cabo durante 10 min a 37°C en una incubadora Grant SS 30 (Grant Instruments. Cambridge). Pasado este tiempo se llevan los tubos a un baño de hielo y con la mayor rapidez posible

se añaden 10 nmoles (α - ^{32}P)ATP ($5-6 \times 10^5$ cpm) junto con los cofactores deseados para cada incubación, teniendo siempre presente que la presencia de los cationes Mg^{2+} o Mn^{2+} resulta imprescindible. La incubación se realiza en las mismas condiciones que el ensayo estándar salvo en lo que se refiere al tiempo que en este caso es sólo de 5 min.

En este tipo de tratamiento el control lo constituyen las muestras no preincubadas.

2.7. TRATAMIENTO TRIPTICO

Al igual que en el caso anterior los tratamientos tripticos se realizan mediante preincubaciones en ausencia de ATP, seguidos de la inhibición de la tripsina y el ensayo posterior de la actividad de adenilato ciclasa residual.

El método de ensayo estándar consiste en una preincubación en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (37°C), con 2-mercaptoetanol 10 mM, 150 nmoles de cAMP, 0.1 μg de tripsina altamente purificada y tratada con TPCK, junto con la preparación enzimática con actividad de adenilato ciclasa (20-40 μg de proteína). Además se pueden incluir en este medio los cofactores ya mencionados en el apartado anterior. La actuación de la tripsina se lleva a cabo a temperatura ambiente durante un periodo de 10 min. A continuación se añaden 0.4 μg de inhibidor de soja para tripsina y se llevan los tubos a un baño de hielo.

Se utilizan como controles, ensayos con la misma composición de preincubación, salvo que se detienen a tiempo cero con el inhibidor de soja, manteniéndose a temperatura ambiente hasta el final de la preincubación.

La acción del inhibidor de soja se controla comparando ensayos en presencia de tripsina detenida a tiempo cero y ensa-

yos en ausencia de la misma.

Una vez inhibida la tripsina se añaden 10 nmoles de (α - 32 P)ATP ($5-6 \times 10^5$ cpm) junto con los cofactores necesarios y se procede a realizar una determinación de adenilato ciclasa, según el ensayo estandar.

2.8. TRATAMIENTO CON FOSFOLIPASA A₂

El ensayo se desarrolla basicamente como el anterior. La preincubación se realiza en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (37°C) 2-mercaptoetanol 10 mM, 150 nmoles cAMP, 175 nmoles CaCl₂, 0.1 μ g de fosfolipasa A₂ libre de actividad triptica, junto con la preparación enzimática (30-50 μ g proteína).

Se añaden además los cofactores igual que se hace con el tratamiento térmico. La reacción se lleva a cabo a temperatura ambiente, durante 10 min. Pasado este tiempo se añaden 200 nmoles de EGTA con objeto de quelar el Ca²⁺ presente en el ensayo, sin el cual la fosfolipasa es inactiva.

Para evitar la interferencia del tratamiento térmico se ensayan controles mantenidos a temperatura ambiente, en presencia de fosfolipasa, pero detenidos a tiempo cero con EGTA. Para comprobar si la detención de la reacción es total y la ausencia de efectos proteolíticos se disponen tubos control en ausencia de fosfolipasa y en presencia de fosfolipasa inhibida por EGTA.

Una vez que se detiene la reacción con EGTA las muestras se introducen en baño de hielo y se añaden 10 nmoles de (α - 32 P)ATP ($5-6 \times 10^5$ cpm) junto con los cofactores deseados y se lleva a cabo la medida de la actividad de adenilato ciclasa según el procedimiento estandar.

En algunos experimentos después del tratamiento con

fosfolipasa A₂ se añaden diferentes cantidades de distintos tipos de lípidos con objeto de paliar los efectos de la fosfolipasa y observar la recuperación de actividad de adenilato ciclasa que de ser así se produciría. La preparación de los lípidos se hizo por sonicación de los mismos en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (37°C) con 2-mercaptoetanol 10 mM, en un sonicador MSE. Los lípidos preparados son fosfolípidos totales de cabezas de Ceratitidis capitata (40 mg/ml), fosfatidilcolina de huevo de gallina (10 mg/ml), trioleína (10 mg/ml) y ácido oleico (10 mg/ml).

Una vez añadidos los lípidos al medio de incubación se mantienen los tubos en baño de hielo durante 15 min, procediéndose a continuación a la realización de un ensayo estandar de adenilato ciclasa como se describió anteriormente.

2.9. CROMATOGRAFIA EN CAPA FINA DE NUCLEOTIDOS

Con objeto de comprobar que el nucleotido purificado en el proceso de ensayo de adenilato ciclasa es cAMP, se dispone un sistema cromatográfico en capa fina que permite resolver los diferentes nucleotidos presentes en el ensayo.

El soporte cromatográfico consiste en: 9 g de Celulosa MN 300, 54 ml de agua y 2 ml de etanol. La mezcla se bate homogeneamente mediante una batidora eléctrica manual, asegurándose de que no queden partículas o grumos que impedirían el perfecto desarrollo cromatográfico. El contenido se extiende sobre placas de vidrio de 20 x 20 cm mediante un extendedor. Las placas se preparan con un espesor de 250 µ. Una vez extendidas se dejan secar durante un día evitando que puedan incidir sobre ellas partículas de polvo.

Las muestras a investigar, radiactivas o no, se preparan generalmente de forma puntual junto con muestras de nucleotidos



patrones y se desarrollan en un sistema butanol-acetona-acético- -NH_3 (5%)- H_2O (7-5-3-3-2) durante aproximadamente 1 hr 30 min (442).

Una vez retiradas las placas de las cubetas y eliminado el disolvente de su superficie se procede al revelado mediante luz U.V. de 254 nm en un aparato Uvatom-70 (Atom). Los nucleótidos aparecen de color violeta intenso, con lo que resulta fácil la señalización de las manchas. Los hR_f más importantes a nuestro objeto son:

	ATP	ADP	AMP	cAMP	HIPOXANTINA	ADENOSINA
$\text{R}_f \times 100$	7	14	32	46	64	64

Las manchas comparadas e identificadas con los patrones pueden ser separadas individualmente de la placa y transpasadas a un vial con líquido de centelleo dioxano-naftaleno a fin de determinar su radiactividad, o bien, eluidas para su valoración espectrofotométrica; esto último resulta más complejo dada la diferente solubilidad de los distintos nucleótidos.

Cuando se procede a la identificación de los productos de ensayo de adenilato ciclasa es menester aplicar una mezcla de todos los nucleótidos para asegurarse de que los arrastres son correctos.

2.10 ANÁLISIS DE LÍPIDOS

2.10.1. EXTRACCIÓN DE LÍPIDOS TOTALES. MÉTODO DE BLIGH Y DYER (441)

Se homogeneizan 40 g de insecto adulto con 80 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C), con 2-mercaptoetanol 10 mM y EDTA 5 mM en un aparato de homogeneización Sorval OMNI-MIXER 17 220, manteniendo la temperatura del homogeneizado entre 0-4°C.

El volumen del homogeneizado se considera como 1 volumen patrón. Sobre esta suspensión se añade metanol (2,1 volúmenes) y cloroformo (1 volumen). Se agita durante 15 min mediante un sistema de barra magnética, en un recipiente hermético previamente gaseado con nitrógeno. Se adicionan a continuación cloroformo (1 volumen) y agua (1 volumen) y se agita en las mismas condiciones durante 5 min.

La suspensión se centrifuga a 4 000 rpm en una centrífuga Christ durante 5 min, recogiénose la fase clorofórmica inferior.

El sobrenadante se extrae de nuevo con 2 volúmenes de cloroformo, se agita y se centrifuga. La fase clorofórmica se reúne con la anterior. Esta extracción se repite dos veces.

Los extractos clorofórmicos reunidos se lavan con un volumen equivalente de la mezcla cloroformo 3 ml - metanol 48 ml - NaCl 0.58% 47 ml, se secan con Na_2SO_4 anhidro y se concentran en un rotavapor Büchi, utilizando si es preciso metanol reactivo (anhidro) para eliminar las últimas trazas de H_2O .

El peso de lípidos totales obtenidos de esta forma fue de 1.5 g.

2.10.2. OBTENCION DE FOSFOLIPIDOS TOTALES

Se preparan placas de silicagel G de 500μ de espesor. Con una proporción de 40 g de silicagel por 80 ml de agua, es posible obtener 5 placas de 20 x 20 cm, utilizando un extendedor de placas Shabdon-Unoplan.

Estas placas se activan durante 60 min a 110°C antes de aplicar en ellas los lípidos totales anteriormente obtenidos, previa solubilización en cloroformo-metanol (2:1). La aplicación se realizó en banda con un contenido de aproximadamente 50 mg por placa.

Una vez seca la aplicación, se separan las distintas clases de lípidos mediante un sistema hexano-eter-acético (65-35-1). El desarrollo dura aproximadamente una hora.

La fracción correspondiente a los fosfolípidos permanece en la aplicación por lo cual no es necesario revelar la placa con ningún revelador convencional de lípidos.

El silicagel que contiene los fosfolípidos se retira cuidadosamente de la placa y se eluye repetidamente con cloroformo-metanol (1-2) y posteriormente con cloroformo-metanol (2-1); éstos eluidos clorofórmicos se secan con Na_2SO_4 anhidro para disminuir la proporción de agua en el disolvente y evitar así que el ácido silícico, ligeramente soluble, pueda contaminar la fracción lipídica. Una vez separado el Na_2SO_4 se procede a eliminar el cloroformo-metanol, llevando los fosfolípidos a sequedad hasta pesada constante.

Los fosfolípidos así obtenidos se gasean con N_2 y se conservan herméticamente cerrados en un congelador a -20°C .

2.10.3. DETERMINACION DE FOSFORO EN FOSFOLIPIDOS

Para determinar la composición de fosfolípidos de las distintas fracciones del gradiente discontinuo de sacarosa en la obtención de las preparaciones particuladas de adenilato ciclasa, se ha procedido a la extracción de los lípidos totales de cada una de las fracciones y a su separación y cuantificación en clases de fosfolípidos.

La extracción de los lípidos totales se hizo conforme al método de Bligh y Dyer ya descrito y una vez obtenidos éstos se pesan y se diluyen con cloroformo-metanol (2-1) para poder efectuar la aplicación de los mismos en una placa de silicagel G de 20 x 20 cm de 300 μ de espesor. La placa se activa durante una hora a 110°C antes de la aplicación, la cual se hace de forma puntual con una masa de 1 mg de lípidos totales por aplicación. La

cromatografía se efectúa en dos direcciones perpendiculares con dos sistemas de desarrollo diferentes: 1º. Cloroformo-metanol-amoniaco (65-25-5), 2º. Cloroformo-acetona-metanol-acético-agua (6-8-2-2-1). Es absolutamente necesario asegurarse de que la placa de silicagel esté completamente seca antes de iniciar el segundo desarrollo, pudiéndose emplear para tal fin una corriente de nitrógeno.

Las placas se revelan con vapores de yodo, se marca el límite de las manchas y se elimina el yodo por sublimación.

Las manchas se retiran de la placa y se introducen directamente en sus respectivos matraces Kjeldahl.

Para hidrolizar los fosfolípidos se adicionan 0.9 ml de HClO_4 al 70% y se calientan los matraces en baño de arena durante 25 min a 250°C . Se sacan y se enfrían a temperatura ambiente, añadiéndose a continuación 7 ml de agua destilada.

Deben incluirse en esta determinación un blanco con silicagel de la misma placa sin lípidos y una serie de muestras controles con diferentes cantidades conocidas de fosfato inorgánico (junto con un blanco sin silicagel) para construir la gráfica de calibrado.

A continuación, sobre los mismos Kjeldahl se adicionan 1 ml de molibdato amónico 2.5% y 1 ml de ácido ascórbico 10% y se calientan en agua a ebullición durante 7 min. Se enfrían en hielo, se centrifuga el contenido a 4 500 rpm en una centrifuga Wifug, hasta eliminar la turbidez y se lee la absorbancia a 820 nm en un colorímetro Coleman Junior II modelo 6/20.

2.10.4. DETERMINACION DE COLESTEROL EN LIPIDOS TOTALES

Utilizando los mismos preparados de lípidos totales obtenidos en el apartado anterior para la determinación de fosfolípidos, se procede a la valoración del contenido en colesterol to

tal (libre y esterificado). Para ello se depositan en un tubo B-19 2.5-5 mg de lípidos totales disueltos en cloroformo-metanol (2-1) y se secan con corriente de nitrógeno. Se adicionan 1 ml de ácido acético glacial, 5 ml de FeCl_3 -acético (sol. 0.05% de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ en ácido acético glacial) y 3 ml de H_2SO_4 concentrado. Se agita y se deja reposar 30 min. Por último se lee la absorbancia a 560 nm en un colorímetro Coleman Junior II modelo 6/20

La curva de calibrado se realiza sometiendo al mismo proceso diferentes alícuotas de una solución patrón de colesterol en ácido acético glacial de 0.5 mg/ml con blancos de referencia sin colesterol.

2.11. PURIFICACION PARCIAL DE LA ADENILATO CICLASA

2.11.1. SOLUBILIZACION

El proceso de solubilización se inicia a partir de una muestra particulada procedente del adulto farato o de las cabezas del insecto adulto en diferentes grados de purificación según el fin que se persiga. Si se persiguen fines analíticos es conveniente partir del preparado de membrana más purificado obtenido según el procedimiento que se utiliza habitualmente para el ensayo de la enzima de membrana. Si se persigue avanzar lo más posible en el grado de purificación, se pueden emplear fracciones particuladas menos purificadas, como por ejemplo, el conjunto de las interfases 1.0-1.5 M y 0.0-1.0 M del gradiente de sacarosa, lo cual proporciona una masa proteica mayor.

La solubilización se realiza manteniendo en agitación la fracción particulada en baño de hielo ($0-4^\circ\text{C}$) durante 30 min, con un tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C), que contiene 2-mercaptoetanol 10 mM, NaF 5 mM, MgSO_4 5 mM, sacarosa 100 mM y lubrol PX 0.5% (p/v) de tal forma que la proporción proteína/ detergente

sea de 1/5 (p/p). Pasado este tiempo se ultracentrifuga la mezcla a 105 000 g, en una ultracentrifuga Beckman-L4 (Rotor R40) durante 60 min. El sobrenadante obtenido constituye la primera etapa de la purificación, con la proteína ya solubilizada (60%).

Con el mismo sistema operativo se puede utilizar en lugar del Lubrol PX, el Triton X-100, si bien, los resultados obtenidos son inferiores a los de aquel.

También se han ensayado procedimientos de estabilización previa de las membranas mediante preincubación con guanidilimidodifosfato (GppNHp). Para ello 0.5 ml de suspensión de membrana (12 mg proteína/ml) se incuban a 0°C durante 15 min con 0.1 ml de GppNHp (8×10^{-4} M) y 0.1 ml de MgSO_4 (8×10^{-2} M). A continuación se adicionan 5 ml de tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C) con 2-mercaptoetanol 10 mM, sacarosa 100 mM y Lubrol PX 0.5%. La mezcla se agita durante 30 min en baño de hielo y se centrifuga a 105 000 g durante una hora en una ultracentrifuga Beckman L4 (Rotor R40). El sobrenadante que contiene la enzima solubilizada se puede utilizar para los ensayos posteriores.

2.11.2. CROMATOGRAFIA EN BIO-BEADS-SM-2

Para eliminar el detergente del sobrenadante de ultracentrifugación se siguió el método de Holloway (443) que utiliza una resina de estireno y divinilbenceno comercializada con el nombre de Bio-Beads-SM-2.

Este se puede efectuar tanto en columna como en suspensión, siendo este último procedimiento el más frecuentemente utilizado.

El sobrenadante de ultracentrifugación se dispone en un vaso de precipitados, junto con una cantidad de resina equivalente a 1 g de resina por cada 4 ml de tampón, lo que supone 1 g de resina/ 20 mg de detergente y se agita la mezcla en un baño de hielo durante una hora. Para separar el Bio-Beads-SM-2 se utiliza

un filtro de lana de vidrio.

2.11.3. CROMATOGRAFIA EN DEAE-CELULOSA

El filtrado de la etapa anterior se carga en una columna (1.5 x 10 cm) de DEAE-celulosa, equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C), con 2-mercaptoetanol 10 mM, MgSO₄ 5 mM, NaF 5 mM, sacarosa 100 mM y lubrol PX 0.01% (p/v). En algunas ocasiones se eliminó del tampón de equilibrado la sacarosa y el lubrol PX, ya que en esta etapa no resultan absolutamente imprescindibles

La columna se lava con el tampón de equilibrado hasta que no aparezca absorbancia a 280 nm. Esta absorbancia se determina mediante un espectrofotómetro de flujo continuo Uvicord II (LKB). A continuación se eluye con una solución NaCl 0.1 M en el mismo tampón de equilibrado. En este caso, suelen aparecer en función del grado de resolución de la columna, tres picos en el registro, el primero de ellos mayor que los otros dos. Por último, se eluye la columna con NaCl 0.2 M hasta que no aparezca señal en el registro.

La actividad de adenilato ciclasa se encuentra fundamentalmente en el primer pico de elución con NaCl 0.1 M, pudiendo aparecer pequeñas cantidades de la misma en los otros eluidos. Es importante señalar que toda la elución se realiza en cámara fría: (4-6°C).

2.11.4. CONCENTRACION POR DIALISIS

Para concentrar la muestra el mejor método consiste en dializar el eluido de DEAE-celulosa frente a una solución concentrada de un polímero de peso molecular superior al poro de la bolsa de diálisis.

Se utiliza polietilenglicol PEG 20 000, al 30% (p/v) en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C) con 2-mercaptoetanol 10 mM,

NaF 5 mM, MgSO_4 5 mM, sacarosa 100 mM y Lubrol 0.01% (p/v).

La muestra se introduce en una bolsa de diálisis Vis-king Tubing 18/32 (The Scientific Instrument Centre Ltd.), que resulta impermeable a sustancias de peso molecular superior a 6 000 D.

La bolsa de diálisis se introduce en polietilenglicol y el conjunto se dializa a $4-6^\circ\text{C}$ con agitación constante. El volumen final de la muestra debe ser de aproximadamente 5 ml.

Tenemos que destacar aquí dos notas importantes. Primero, es muy importante que la concentración se realice en el menor tiempo posible para evitar la inactivación de la enzima y segundo, hay que controlar siempre la diálisis por si se produce turbidez en la muestra. El tiempo de diálisis se puede acortar incrementando la concentración de polietilenglicol hasta un 50 ó 60%, o bien, cambiando varias veces el tampón de diálisis.

Desde que se procede a la homogeneización de la muestra hasta este momento, no deben de transcurrir más de 10 ó 12 hr, ya que la enzima se deteriora progresivamente a una velocidad elevadísima. Después de la concentración, la actividad residual no supera nunca el 20% de la actividad inicial, siendo en la mayoría del los casos inferior al 10%.

El sistema de concentración por ultrafiltración con AMICON modelo UF52 equipado con una membrana PM 30 de 62 mm de diámetro, impulsada por corriente de nitrógeno a una presión de 2-3 atmósferas y mantenido en baño de hielo, conduce en todos los casos a una pérdida absoluta de la actividad, con aparición de fuerte turbidez en la muestra.

2.11.5. CROMATOGRAFIA EN ULTROGEL Aca 22

La muestra resultante de la etapa anterior se carga por el método de densidad, en una columna (3 x 30 cm) de ultrogel Aca 22, equilibrada con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C) con 2-mercaptoetanol 10 mM, NaF 5 mM, MgSO₄ 5 mM, sacarosa 100 mM y Lubrol PX 0.01%. En algunos casos ha sido conveniente eliminar la sacarosa del tampón para aumentar así el flujo de la columna.

La columna se mantiene a un flujo de 8-10 ml/hr y las fracciones de 5 ml de eluido se recogen en un colector automático LKB 2112 Rediac. La elución se puede seguir mediante absorción a 280 nm con un espectrofotómetro de flujo continuo LKB Uvicord II 8 300, acoplado a un registro LKB Chopper Bar Recorder 6 520. De esta forma es muy fácil la localización de las fracciones con nuestra proteína. A veces se hace necesario una determinación espectrofotométrica más sensible y para ello se utiliza un espectrofotómetro Cary 118 (Varian), midiéndose la absorbancia a 237 nm. La cromatografía se desarrolla en unas 12 hr aproximadamente, realizándose la valoración enzimática correspondiente.

Las fracciones se pueden reunir y concentrar por diálisis nuevamente, si bien, considerando la pérdida de actividad con el tiempo, suele ser más conveniente utilizar exclusivamente la zona de máxima actividad de la columna sin concentrar.

Llegados a este punto la proteína puede tener una actividad que oscila entre 5 y 15 pmol/50μlx 10 min, ensayada en presencia de MnCl₂ 1 mM en la fracción de máxima actividad.

2.11.6. CONSERVACION DE LA PROTEINA SOLUBLE

La proteína soluble después de la ultracentrifugación inicial y en todos y cada uno de los pasos, puede conservarse congelada a -70°C durante al menos dos semanas sin pérdida aparente de actividad.

2.11.7. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR APARENTE

La muestra solubilizada según se describió en el apartado anterior fue sometida a una determinación de su peso molecular mediante cromatografía de penetrabilidad en Ultrogel AcA 22.

Se utiliza una columna (1.6 x 22 cm) de Ultrogel, preparada según se ha descrito y equilibrada en tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C) con 2-mercaptoetanol 10 mM, $MgSO_4$ 5 mM, NaF 5 mM, sacarosa 100 mM y lubrol PX 0.01%. El flujo se mantiene a 7 ml/hr. Las fracciones se recogen en un colector LKB 2112 Redirac, calibrado de tal forma que cada fracción de 30 gotas posee un volumen de 1.2 ml, lo cual permite recoger 6 fracciones/hr.

Todas las muestras se cargan en la columna mediante el sistema de aplicación por densidad, empleando sacarosa pulverizada.

El volumen de muestra aplicada es de 0.5 ml y la masa de proteínas de calibrado utilizada oscila entre 0.5 y 1 mg.

El volumen de exclusión de la columna se comprueba con azul dextrano, siendo éste de 21 ml. El azul dextrano se utiliza también al final del calibrado de la columna para comprobar la perfecta homogeneidad de los desarrollos cromatográficos.

Las proteínas utilizadas como referencias fueron:

- 1º. Tiroglobulina de tiroides bovino. Peso molecular 669 000 D (2 x 335 000 D). Se presenta también con un peso molecular de 1 338 000 D (Edelhoch H. y de Crombrugghe B. (1966) J. Biol. Chem. 241, 4357).
- 2º. Glutamato deshidrogenasa de hígado bovino. Peso molecular 2 000 000 D (8 x 250 000 D). Se presenta también con un peso molecular de 1 000 000 D y 500 000 D (Apella E.; Tomkins G. (1966) J. Mol. Biol. 18, 77).
- 3º. Catalasa bovina. Peso molecular 232 000 D (4 x 57 000 D) (Doyhoff M.O. (1973) "Atlas of Protein Sequence and Structu-

re" vol. 5 National Research Fundation. Silver Spring. Md.).

42. α - Amilasa de Bacillus subtilis. Peso molecular 97 600 D
(2 x 48 000 D) (Kakiuchi K., Hamaguchi K., Isemura T. (1965)
J. Biochem. (Tokyo) 57, 167).

La detección de los volúmenes de elución de las proteínas patrones se realiza mediante el empleo de un espectrofotómetro Cary 118 (Varian) a longitudes de onda de 280, 230 ó 210 nm según la sensibilidad requerida.

Todas las eluciones se llevan a cabo por duplicado.

La detección de la adenilato ciclasa solubilizada se realizó con 75 μ l de eluido . La valoración del contenido proteico se realiza espectrofotometricamente a 237 nm.

2.12. PURIFICACION DE LA PROTEINA RECEPTORA DE cAMP

2.12.1. HOMOGENEIZACION

Aunque se han utilizado diferentes estadios del insecto, el material biológico más empleado ha sido las cabezas del insecto adulto dado que presentan en relación a su masa una mayor actividad receptora de cAMP.

Se parte habitualmente de 3-4 g de cabezas, las cuales se homogeneizan en un homogeneizador Potter-Elvehjem, equipado con un émbolo de teflón, junto con 3 volúmenes de tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7.0, que contiene 2-mercaptoetanol 10 mM. Este proceso se realiza en frío, procurando que la temperatura de la muestra no exceda nunca de los 6°C. El homogeneizado así obtenido se centrifuga a 37 000 g en una centrífuga Sorvall RC2-B (Rotor SS34) refrigerada entre 0-4°C durante 20 min. El sedimento se desprecia y el sobrenadante se filtra por gasa. A continuación se recentrifuga a 37 000 g durante 15 min y el sobrenadante se filtra por lana de vidrio muy compacta. El filtrado resultante constituye la primera etapa del proceso (SC1).

A continuación se lleva a cabo una precipitación ácida o con sulfato amónico según los fines que se persigan.

2.12.2. PRECIPITACION ACIDA

El filtrado anterior se lleva a pH 4.8 con ácido acético 1 M, manteniendo la muestra en un baño de hielo, con agitación constante. El pH se determina mediante un pHmetro Radiometer. Una vez alcanzado el pH mencionado se mantiene en agitación durante 20 min. A continuación se centrifuga a 37 000 g durante 15 min y el sobrenadante se lleva con KOH diluida hasta pH 7.0. A veces es necesario centrifugar de nuevo la muestra a 37 000 g durante 15 min para eliminar la ligera turbidez que aparece. El sobrenadante se dispone así para la siguiente etapa (SH).

2.12.3. PRECIPITACION CON SULFATO AMONICO

El filtrado (SC1) o el sobrenadante (SH), se tratan con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ sólido, perfectamente triturado hasta conseguir un 30% de saturación. La muestra se mantiene en baño de hielo con agitación constante durante una hora y se centrifuga a continuación a 37 000 g durante 15 min. El sobrenadante se lleva hasta el 70% de saturación mediante el mismo procedimiento y se centrifuga a 37 000 g durante 15 min. El sedimento se resuspende en el mínimo volumen posible de tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7.0, con 2-mercapto-etanol 10 mM y se dializa durante una noche frente al mismo tampón en una bolsa de diálisis Visking Tubing 18/32. Si después de la diálisis, la muestra se encuentra ligeramente turbia, se centrifuga a 37 000 g durante 15 min y el sobrenadante se dispone así para la siguiente etapa (SP).

2.12.4. BIOGEL-HTP

Se prepara una columna (1.6 x 17 cm) de Biogel HTP (Hi

droxiapatito) equilibrada con tampón fosfato potásico 10 mM con 2-mercaptoetanol 10 mM y se carga con las fracciones (SC₁), (SH) o (SP), según los casos. La columna se eluye a una temperatura de 4-6°C con un gradiente continuo de fosfato potásico 10-200 mM, pH 7.0, con 2-mercaptoetanol 10 mM, obtenido por mezcla de 50 ml de tampón fosfato potásico 10 mM y 200 mM, mediante un sistema de formación de gradientes lineales. Las fracciones (3 ml) se recogen en un colector acoplado a un espectrofotómetro de flujo continuo (4-6°C). El flujo de elución de la columna es de 20 ml/hr y para ello la presión hidrostática es de 50 cm de H₂O.

Las fracciones se ensayaron según el método de unión de cAMP ya descrito, reuniéndose los que presentan actividad receptora de cAMP sin actividad de proteína quinasa.

2.12.5. CONCENTRACION POR DIALISIS

El conjunto de fracciones de Biogel-HTP de la etapa anterior se concentran por diálisis frente a polietilenglicol, PEG 20 000, al 20% (p/v) en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7.0, con 2-mercaptoetanol 10 mM, utilizando una bolsa de diálisis Visking Tubing 18/32, a 4-6°C. La muestra se concentra hasta unos 5 ml.

2.12.6. DIALISIS

Con objeto de eliminar el exceso de fosfato o para cambiar el tampón, siempre que interese detener aquí el proceso de purificación, la muestra concentrada con polietilenglicol, se dializa frente a tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7.0, con 2-mercaptoetanol 10 mM o frente a tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (37°C), con 2-mercaptoetanol 10 mM cuando se utiliza para determinaciones de niveles de cAMP, en las condiciones apuntadas.

A veces resulta interesante utilizar en esta etapa bolsas de diálisis del tipo Visking Tubing 20/32, que tienen un po-

ro mayor, impermeable a pesos moleculares superiores a 45 000 D, con lo que se logra una ligera purificación por eliminación de sustancias de peso molecular inferior al tamaño del poro.

2.12.7. SEPHADEX G-100

Los 5 ml de la etapa anterior se cargan por densidad en una columna (3 x 90 cm) de Sephadex G-100, equilibrada con tampón fosfato 10 mM, pH 7.0, con 2-mercaptoetanol 10 mM. Se eluye la muestra con el mismo tampón manteniendo un flujo de 20 ml/hr a 4-6°C. Se recogen fracciones de 5 ml mediante colector LKB 2112 Redirac y se determina la proteína eluida a 280 nm mediante el espectrofotómetro de Flujo continuo. La actividad receptora de cAMP se detecta inmediatamente después de la aparición de proteína en las fracciones correspondientes al volumen de exclusión (155 ml determinado por azul-dextrano).

Cuando no se trabaja con la fracción de máxima actividad es necesario proceder a la concentración por diálisis de la muestra como se operó anteriormente.

Llegados a este punto, la cantidad de proteína suele ser muy pequeña, pero, ya que la proteína se encuentra mucho más pura, es interesante determinar en esta etapa las especificidades de unión.

2.12.8. SEPHADEX G-200

A veces, en lugar del Sephadex G-100 se utiliza una columna (1.6 x 95 cm) de Sephadex G-200, equilibrada y eluida con el mismo tampón que el Sephadex G-100 con un flujo de 7 ml/hr, recogiendo fracciones de 33 ml.

Con este procedimiento se consigue una mayor resolución que en el caso anterior. El volumen de elución de la proteína es muy superior al volumen de exclusión (50 ml determinado por azul dextrano).

2.12.9. CONSERVACION

La proteína se puede conservar a -70°C durante varias semanas, sin que se observe pérdida de la capacidad de unión de cAMP. En la última etapa de purificación se puede producir desnaturalización durante el periodo de congelación, posiblemente debido a que la masa de proteína es muy pequeña y como hemos observado con otras proteínas la masa puede ser una cuestión crítica en la congelación.

También es posible conservar la proteína a temperaturas de $0-4^{\circ}\text{C}$ en baño de hielo o en cámara fría durante periodos que no excedan a una semana.

2.13. VALORACION DE PROTEINAS

La valoración de proteínas se hizo mediante dos métodos, según que las muestras tuviesen o no detergente.

2.13.1. METODO DE LOWRY (447)

Este es uno de los procedimientos convencionales más utilizados en la determinación de proteínas en ausencia de detergente.

Para realizar la valoración, se prepara una solución de Na_2CO_3 al 2% en NaOH 0.1 N (Reactivo A) y una solución de $\text{CuSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ al 0.5% en tartrato sódico al 1% (Reactivo B). A partir de estas dos soluciones se prepara una tercera (Reactivo C), que contiene un volumen de reactivo B por cada 50 volúmenes del reactivo A. La proteína que se ha de valorar se dispone en un tubo de ensayo, diluida con agua destilada hasta un volumen final de 1 ml. Se adicionan entonces 5 ml de reactivo C, se agita y se deja reposar 15 min. Transcurrido este tiempo se añaden 0.5 ml de reactivo Folin diluido (1 volumen de reactivo Folin-Ciocalteu más 2 volúme-

nesde H_2O). Se agita y la mezcla se deja reposar 30 min, apareciendo en los tubos una coloración azul, cuya absorbancia se determina a 500 nm o a 740 nm si el color no es muy intenso, frente a un blanco preparado sin proteína de la misma forma antes descrita. La absorbancia se determina en un espectrofotómetro Coleman Junior II, modelo 6/20.

La concentración de proteína en el problema se deduce a partir de una curva patrón construida con los datos de absorbancia obtenidos con diferentes volúmenes de una solución de albúmina de 1 mg/ml.

Hay que tener una precaución adicional cuando la proteína que se va a valorar se haya disuelta en primera instancia en un tampón que contiene 2-mercaptoetanol. Como esta sustancia de color azul con el reactivo de Folin Ciocalteu producirá un color de fondo en el ensayo que es necesario corregir mediante un blanco que contenga la misma cantidad de 2-mercaptoetanol que los tubos problema. En cualquier caso la cantidad de 2-mercaptoetanol no debe de exceder de 1 μ mol, ya que entonces la coloración es muy intensa y la interferencia es considerable.

2.13.2. METODO DE DULLEY Y GRIEVE (448)

Este método se aplica a la determinación de proteínas solubilizadas en detergentes tales como triton X-100 o lubrol PX.

La preparación de la muestra es en lo único que difieren los dos métodos. En este caso la proteína se diluye con agua destilada hasta 0.5 ml y a continuación, se añade 0.5 ml de una disolución de SDS al 6% en agua destilada. Esto supone que la proteína se encuentra en un volumen final de 1 ml como antes, pero en presencia de SDS al 3%. El resto del ensayo es idéntico al método de Lowry.

La valoración espectrofotométrica se lleva a cabo a

740 nm, ya que las proteínas solubilizadas por detergentes suelen encontrarse fuertemente diluidas y por lo tanto, la masa en el ensayo es habitualmente pequeña.

Con respecto al 2-mercaptoetanol hay que tener las mismas precauciones que antes y además es conveniente incluir en el blanco la misma cantidad de triton X-100 o lubrol PX, que contengan las muestras problemas.

2.14. PREPARACION DE LOS SOPORTES CROMATOGRAFICOS

2.14.1. DOWEX

La resina que se utilizó fue Dowex 50W x 4 (H^+). Su preparación requiere unicamente un lavado con 15 volúmenes de agua destilada, quedando ya dispuesta para ser cargada en las columnas

Su regenerado se realiza mediante lavado con HCl 1N y posterior eliminación de éste por sucesivos lavados con agua destilada.

Para regenerar una columna "in situ" de 0.6 x 8.0 cm (ensayo de adenilato ciclase), se requieren 2 ml de HCl 1N, seguido de un lavado con 20 ml de agua destilada.

2.14.2. DEAE-CELULOSA

Se prepara agitando durante 30 min el cambiador en 15 volúmenes de HCl 0.5 N. Se lava a continuación con agua destilada hasta alcanzar un pH óptimo a 5.0 y se agita nuevamente durante otros 30 min con 15 volúmenes de NaOH 0.5 N, distribuidos en dos lavados. Para eliminar el álcali se procede a un lavado intensivo con agua destilada hasta alcanzar un pH próximo a 8.0. Se procede entonces a su desgasificación y equilibrado. Manteniendo la suspensión en un pH inferior a 5.0 se somete en un erlenme-
yer-Kitasato a desgasificación mediante vacío. Desgasificada la

resina, se equilibra con el componente básico del tampón hasta el pH deseado y se procede al lavado de la misma, con el tampón de equilibrado hasta lograr las condiciones de equilibrado deseado.

Habitualmente se ha utilizado como tampón de equilibrio Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C) con 2-mercaptoetanol 10 mM.

Para evitar el crecimiento microbiano se añade NaN_3 0.02%

2.14.3. ALUMINA

Se lava con una solución tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7.2 (25°C) y directamente se puede montar en columnas, equilibrándolas con este mismo tampón.

2.14.4. BIOGEL HTP

La forma sólida del Biogel se prepara mediante lavados sucesivos con el tampón de equilibrado deseado, pudiéndose cargar a continuación en las columnas, sin que sea necesario un equilibrado posterior.

El tampón utilizado por nosotros suele ser fosfato potásico 10 mM, pH 7.0 con 2-mercaptoetanol 10 mM.

Es conveniente utilizar las columnas poco tiempo después de su montaje, ya que en caso contrario se puede producir un empaquetamiento fuerte de la matriz que impide un desarrollo rápido de la cromatografía.

Si se quieren realizar separaciones críticas no es conveniente regenerar el Biogel HTP, ya que pierde parte de su poder resolutorio después del primer desarrollo. Ahora bien, a tal fin pueden utilizarse una solución de tampón fosfato potásico 1 M, pH 7.0 con equilibrado posterior del soporte. Si después de esto, queda retenida alguna sustancia, se puede lavar el Biogel HTP con una solución de NaOH 0.1 M procediendo a su equilibrado posterior. No se debe hacer la regeneración en la columna porque se pro

duce empaquetamiento de la matriz.

2.14.5. ULTROGEL

El gel se presenta hinchado y se precisa simplemente una desgasificación a vacío y equilibrado con el tampón elegido.

Es conveniente mantener el gel protegido de la luz intensa y a temperaturas de 4-6°C, lo cual evita su deterioro y el ataque por agentes microbianos, si bien, esto último puede lograrse también, añadiendo NaN_3 al 0.02%.

Una de las ventajas de utilización de estos geles es que permiten flujos elevados debido a su alta resistencia a la rotura, lo que hace que soporten presiones hidrostáticas elevadas.

2.14.6. SEPHADEX

Se hincha el gel manteniéndolo a temperatura ambiente en agua destilada durante 3 días o a ebullición durante 5 horas.

Una vez hinchado se procede a su desgasificación a vacío.

Durante las operaciones de montaje y equilibrado de las columnas debe mantenerse en todo momento la misma presión hidrostática sobre el gel con objeto de evitar empaquetamientos no uniformes o excesivos.

2.14.7. BIO-BEADS-SM-2

Esta resina se preparó según recomienda Holoway (444), suspendiendo las partículas de la misma en metanol (10 g resina/ 50 ml MeOH) y agitando durante 15 min. Esto se repite dos veces. A continuación se procede a eliminar el metanol mediante lavados sucesivos con agua destilada. Una vez eliminado el metanol, se filtra la resina a vacío para eliminar el agua en cuanto sea posible y se pesa para su posterior adición al vaso de precipitados, junto con la mezcla de la cual se quiere extraer el detergente.

La regeneración de la resina se realiza por el mismo procedimiento, si bien, resulta conveniente incrementar el número de lavados con metanol.

2.14.8. BLUE-SEPHAROSA CL-6B

Este soporte se utiliza habitualmente para cromatografías de pseudoafinidad, y se suministra en forma de polvo seco, que es necesario mantener en refrigeración por debajo de 8°C. Para prepararlo se lava repetidas veces con agua destilada en un filtro de vidrio sinterizado conectado a un sistema a vacío. A continuación se pasa a un recipiente de vidrio donde se pone en contacto con el tampón de equilibrado que se vaya a utilizar posteriormente. Esta suspensión se mantiene, al menos, un día para favorecer el total hinchamiento de la matriz y posteriormente se desgasifica a vacío.

El relleno de la columna se realiza con las mismas precauciones que se toman para cualquier soporte de cromatografía de penetrabilidad, procurando una compactación uniforme y evitando un empaquetamiento excesivo.

Aproximadamente 1 g de polvo seco proporciona 3.5 ml de lecho con una capacidad de unión de 5 mg/ml calculada con albúmina de suero en fosfato sódico 0.1 M, pH 7.0.

2.15. LIQUIDOS DE CENTELLEO

DIOXANO - NAFTALENO

PPO	10.50 g
POPOP	0.45 g
Naftaleno	150.00 g
Dioxano hasta 1500	ml

TOLUENO

PPO 4 g
POPOP 40 mg
Tolueno 1 000 ml

tT 21

PPO 4,0 g
POPOP 0,1 g
Tolueno 1 000 ml
Triton X-100 500 ml

2.16. CONDICIONES DE CONTAJE

Se utilizó un espectrofotómetro de centelleo líquido tipo Packard Tri-Carb 3255, equipado con sistema automático y manual de elección de ganancia y apertura de ventanas para el conteo de emisores. La concentración de ^3H se ha medido en todos los casos en las condiciones automáticas prefijadas por el aparato $^3\text{H}/\text{Q } ^3\text{H}$.

La concentración de ^{32}P se mide en las condiciones seleccionadas previamente.

Ventana: 20 - 1 000. Ganancia 1.5%

El tiempo de conteo varia con la muestra de forma que los errores de conteo sean inferiores al 1%.

El grado de amortiguación (quenching) de las muestras se determina automaticamente por el método de estandar externo (ESR).

2.17. CALCULO DE LA ACTIVIDAD DE ADENILATO CICLASA

Existen varias formas de cálculo según el tipo de aproximaciones conceptuales que se realicen para el desarrollo matemático.

tico del mismo.

Vamos a exponer aquí tres métodos de simplificación:

A: El primero supone considerar que el factor de amortiguación ("quenching") en todos los viales es idéntico, como se comprueba por los valores de ESR obtenidos, y que la eficacia del tritio en el canal del fósforo es muy pequeña, aproximadamente constante. Ambos hechos son correctos dentro de los límites de error del contador utilizado. Según esto los nmoles de cAMP formado en el ensayo serán:

nmol cAMP formado = nmol cAMP ensayo - nmol cAMP blanco

$$\text{nmol cAMP ensayo} = N_A \frac{P - T_{HP}}{T_P - F_P} \times \left[(H - F_H) - \frac{(T_{PH} - F_H)(P - F_P)}{(T_P - F_P)} \right]^{-1} \times (T_H - F_H)$$

Donde: N_A = nmol de ATP (frio + marcado) de la incubación inicial

P = cpm de (^{32}P)cAMP recuperadas

H = cpm de (^3H)cAMP recuperadas

T_P = cpm del (α - ^{32}P)ATP totales añadidas en la incubación en el canal de ^{32}P

T_H = cpm del (^3H)cAMP añadidas para determinar la recuperación en el canal de ^3H

T_{PH} = cpm del (α - ^{32}P)ATP totales añadidas en la incubación en el canal de ^3H

T_{HP} = cpm del (^3H)cAMP totales añadidas en la recuperación en el canal de ^{32}P .

F_P = Fondo del aparato en el canal de ^{32}P

F_H = Fondo del aparato en el canal de ^3H

Los nmoles del blanco se determinan de la misma forma salvo que en lugar de P y de H se colocan los valores obtenidos con el blanco.

Según el tiempo de incubación y los mg de proteína del ensayo se corrige el resultado para expresarlo en nmol/min mg proteína.

B: Este método considera lo mismo que en el caso A, pero tiene en cuenta además que F_P y F_H son despreciables frente a T_P , T_{PH} y T_H y que el fondo introducido por el blanco es constante y de 10 cpm en el canal del ^{32}P con lo que el cálculo queda así:

$$\text{nmoles de cAMP formados} = \frac{P - T_{HP} - 10}{T_P} \times \left[H - \frac{T_{PH} \cdot P}{T_P} \right]^{-1} \times T_H \times N_A$$

Obteniéndose así el valor de nmoles de cAMP directamente sin modificación significativa frente al cálculo A.

C: Cuando P es menor de 1 000 cpm y H mayor de 20 000 cpm, el cálculo se puede simplificar aun más quedando como sigue:

$$\text{nmoles de cAMP formados} = \frac{P - T_{HP} - 10}{T_P} \times \frac{T_H \cdot N_A}{H}$$

Esto se puede hacer ya que el valor de $\frac{T_{PH} \cdot P}{T_P}$ es despreciable frente a H, al ser P y T_{PH} pequeñas y T_P grande.

3.- RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. CONDICIONES DE ENSAYO

3.1.1. ADENILATO CICLASA

3.1.1.1. ENSAYO CROMATOGRAFICO

La puesta a punto del método de ensayo para valorar la adenilato ciclasa planteó en sus comienzos el problema de la reducción del fondo del ensayo. Los métodos cromatográficos de White y Zenser (437), Krishna y Birnbaumer (438) y otras modificaciones propuestas para los mismos (449) no permitían obtener valores de fondo inferiores al 10% del valor absoluto del ensayo. Fue necesario acudir al método de Solomon y col (15) para reducir el valor del fondo. Este método utiliza dos columnas en serie de Dowex 50WX4 y alúmina neutra, por lo que es necesario establecer los patrones de elución del cAMP en ambas columnas. Primero se determinó la elución en Dowex del cAMP contenido en 1.5 ml de agua destilada (150 nmoles de cAMP 270 000 cpm (8-³H)cAMP). A continuación se hizo lo mismo con la alúmina utilizando un volumen equivalente de muestra: al que eluiría del Dowex. La elución del Dowex se realizó con agua destilada, en tanto que la de la alúmina se hizo con tampón Tris-HCl 100 mM, pH 7.2. Los resultados se representan en la fig. 15. En base a los mismos se estableció la secuencia correcta de elución que fue expuesta en el apartado anterior.

Un aspecto que presentó algunos problemas fue la elección del método de detención de la reacción. Como ya se describió, la detención se realiza en primera instancia con ZnSO_4 , potente inhibidor de la actividad enzimática, seguido de la formación de un precipitado de ZaCO_3 por adición de Na_2CO_3 , el cual atrapa los nucleótidos no cíclicos presentes en el medio, constituyendo así, en primera instancia, un paso importante en la purificación del cAMP. Este método tiene la ventaja además de no uti

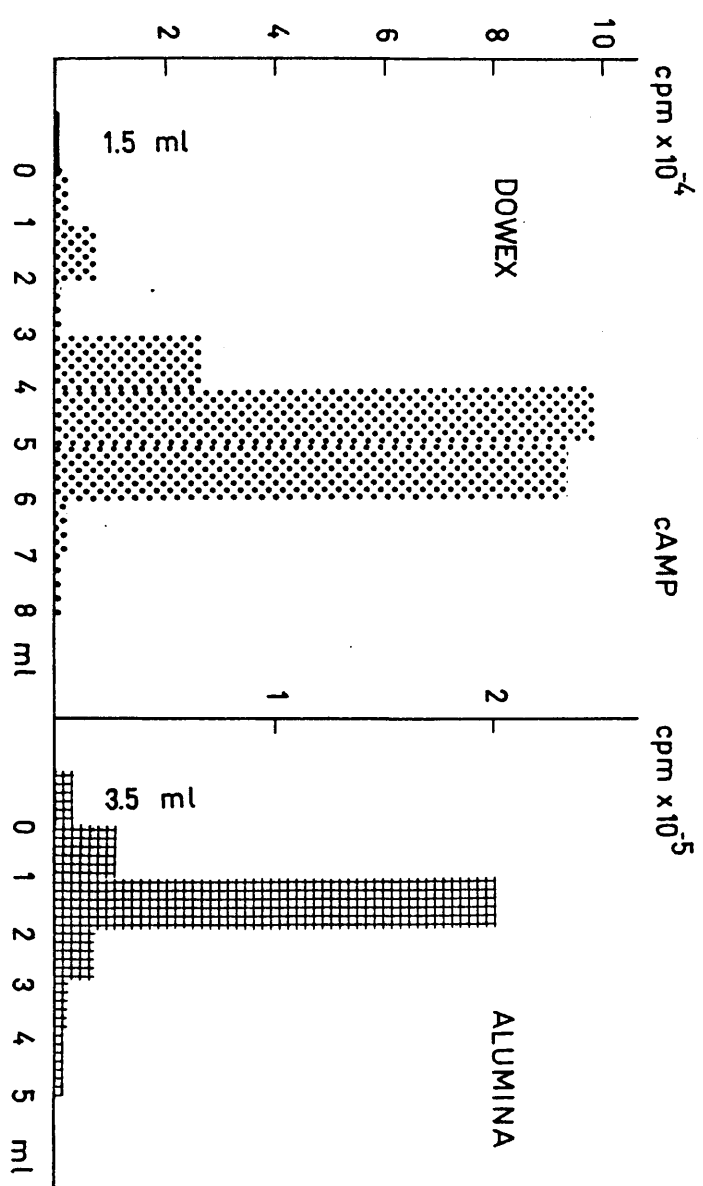


FIGURA 15. Perfiles de elución del (8-³H)cAMP en Dowex 50Wx4 y alumina.

lizar ningún proceso de calentamiento, proceso que se ha comprobado impropio porque aumentan los fondos, posiblemente por formación de productos de hidrólisis que cromatografían con el cAMP. Permite también la utilización de tubos desechables de plástico que hacen el ensayo más limpio y menos costoso.

Se han probado otros métodos de detención por metanol, etanol, TCA, SDS y EDTA, pero, en general, estos procedimientos presentan diversos inconvenientes a la hora de la separación cromatográfica.

Hay que señalar que para que el método sea efectivo es necesario utilizar contraiones para el Zn^{2+} y el CO_3^{2-} que sean ácidos y bases muy débiles, ya que las variaciones de pH alteran los patrones de elución. Así, por ejemplo, resulta impropio la utilización del acetato de zinc en lugar del sulfato.

3.1.1.1.1. COMPROBACION DE LA PUREZA DEL PRODUCTO FINAL

Se desarrollaron distintas muestras en un sistema específico para nucleótidos y que en concreto se había mostrado especialmente óptimo para separar el cAMP. Las aplicaciones correspondientes a la fig 16 fueron las siguientes:

APLICACION CONTENIDO

- | | |
|----|---|
| 1º | Patrones de ATP, ADP, AMP, cAMP, Adenosina (AD), Hipoxantina (XH) |
| 2º | (8- ³ H)cAMP comercial con cAMP como portador. |
| 3º | 25 µl de la mezcla de incubación de A.C. detenida a t. 0'. |
| 4º | 25 µl de la mezcla de incubación de A.C. detenida a t. 3'. |
| 5º | 25 µl de la mezcla de incubación de A.C. detenida a t. 10'. |
| 6º | 50 µl del cAMP purificado por el procedimiento estándar. |

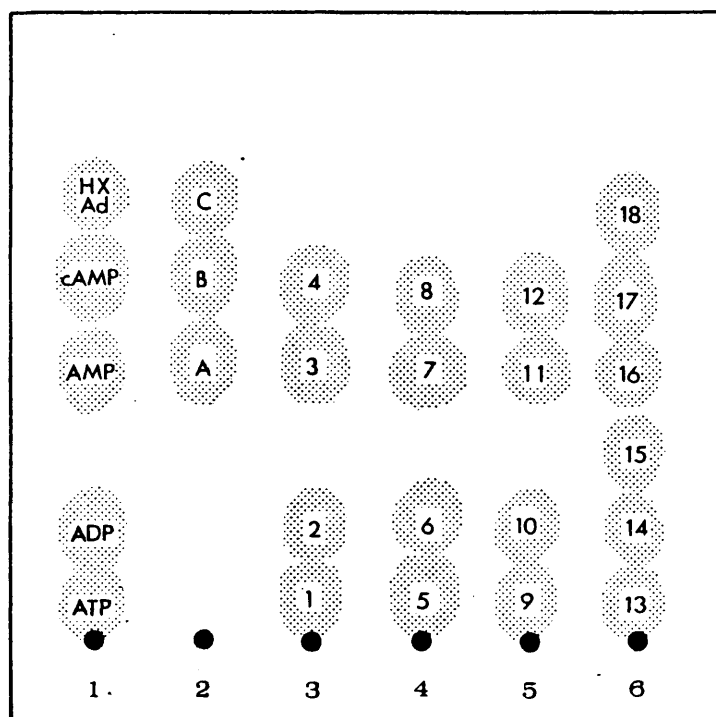


FIGURA 16. Cromatografía en capa fina de nucleotidos.

La incubación de la adenilato ciclasa (A.C.) se realizó en presencia de Mg^{2+} 10 mM, Mn^{2+} 1 mM y F^{-} 10 mM.

La detención de las muestras de las aplicaciones 3, 4 y 5 se hizo por calentamiento a ebullición durante 1 min.

Los resultados de la cromatografía quedan reflejados en la tabla 12.

TABLA 12: Determinación del contenido en ^{32}P ó 3H de los nucleótidos separados en la cromatografía de la fig. 16

	cpm de ^{32}P				cpm de 3H	
	APLICACION	APLICACION	APLICACION	APLICACION	APLICACION	
	3	4	5	6	2	
ATP	1.- 31 920	5.- 25 182	9.- 9 800	13.- 0		
ADP	2.- 3 254	6.- 7 755	10.- 6 351	14.- 0		
	---	---	---	15.- 0		
AMP	3.- 901	7.- 8 650	11.- 11 785	16.- 0	A	190
cAMP	4.- 175	8.- 4 507	12.- 5 478	17.- 669	B	4 424
AD-HX	---	---	---	18.- 0	C	466

Según esto resulta evidente que el producto de la aplicación 6, resultado de la separación cromatográfica del ensayo, es cAMP prácticamente puro, ya que no se detecta radiactividad en otras zonas de la placa.

En la tabla 13 se representan los porcentajes relativos.

3.1.1.1.2. CONDICIONES GENERALES DEL ENSAYO

Las condiciones óptimas para el ensayo se establecieron en base a los siguientes criterios:

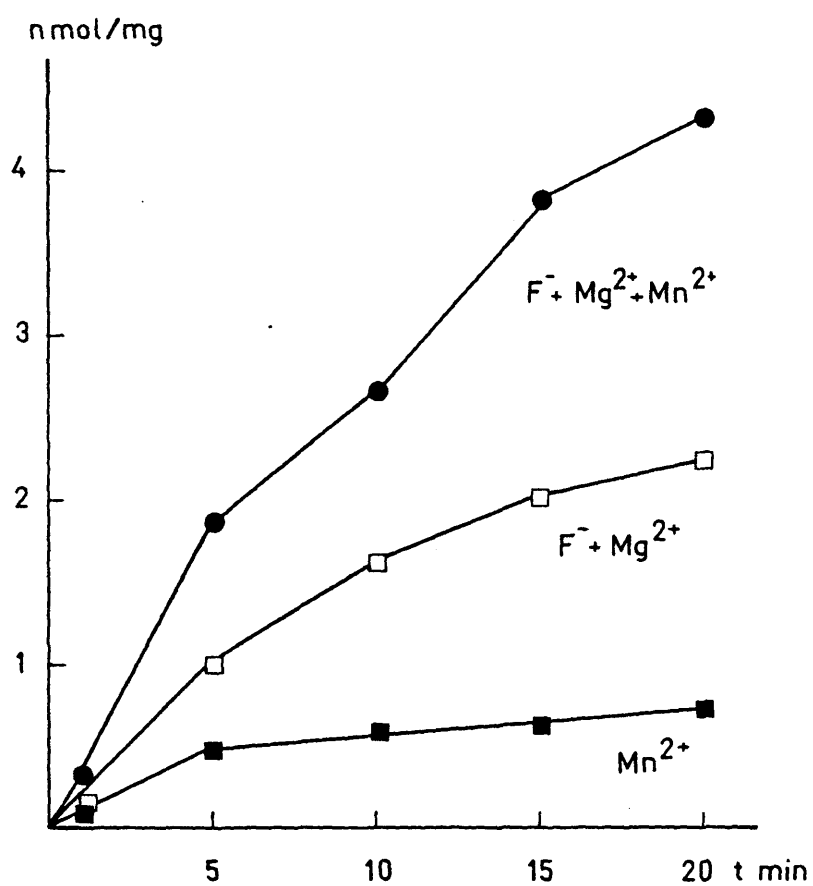


FIGURA 17. Variación de la actividad de adenilato ciclasa de adulto farato en función del tiempo, en presencia de diferentes cofactores. La actividad se expresa en nmol cAMP/mg proteína.

142

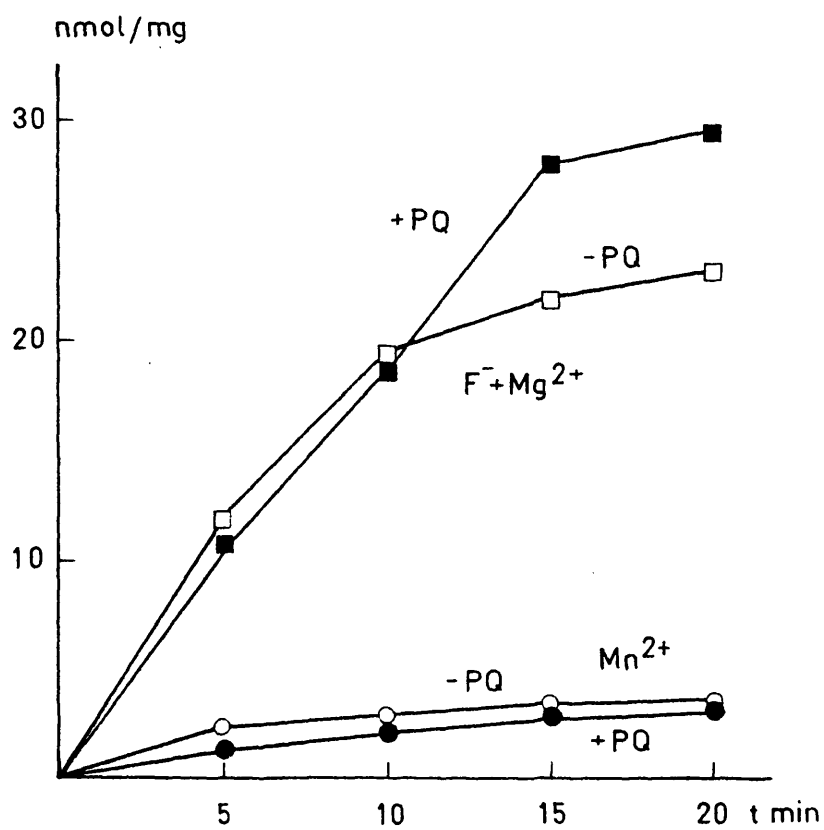


FIGURA 18. Variación de la actividad de adenilato ciclasa de cabeza de adulto en función del tiempo, en presencia del sistema regenerador de ATP (PEP/ piruvato quinasa) (PQ). La actividad se expresa en nmol cAMP/mg proteína.

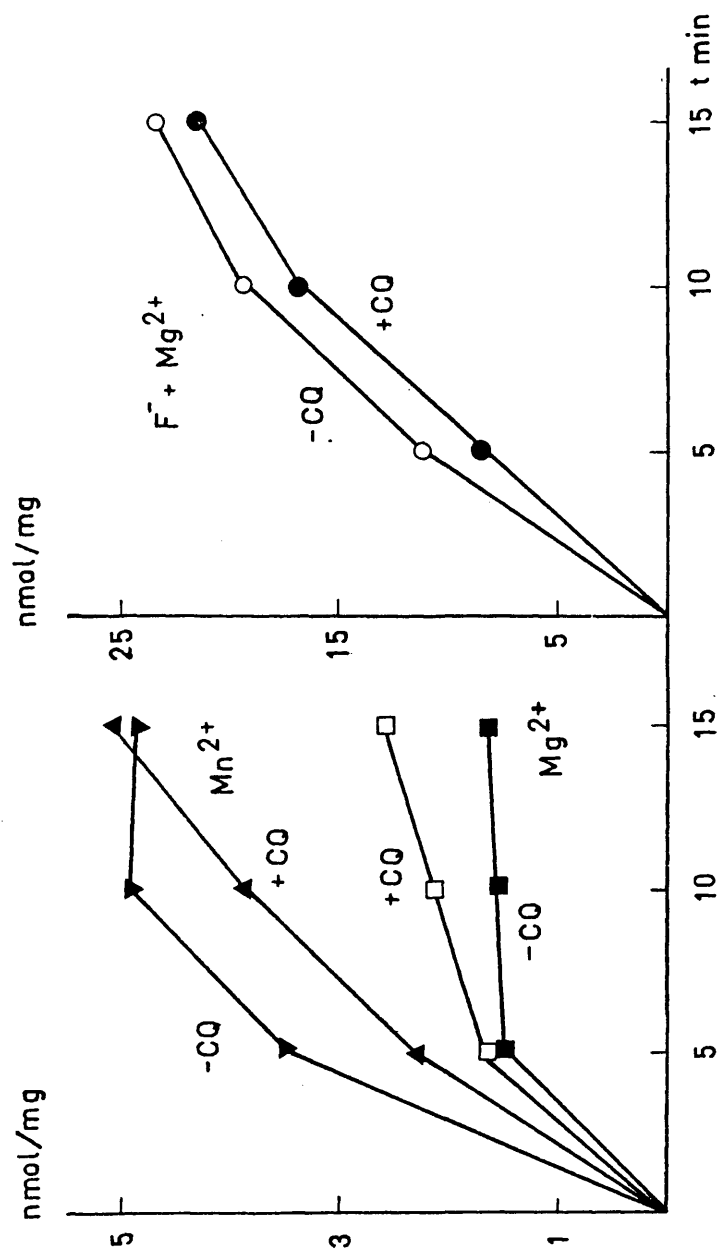


FIGURA 19. Variación de la actividad de adenilato ciclasa de cabeza de adulto en función del tiempo, en presencia del sistema regenerador de ATP (fosfocreatina/creatinafosfoquinasa) (CQ). La actividad se expresa en nmol cAMP/mg proteína.

TABLA 13: Porcentajes relativos de ^{32}P en las distintas aplicaciones de la fig. 16.

	<u>APLICACION 3 (%)</u>	<u>APLICACION 4 (%)</u>	<u>APLICACION 5 (%)</u>
ATP	88	54	29
ADP	9	17	19
AMP	2.5	19	35
cAMP	0.5	10	16

CONCENTRACION DE SUSTRATO.- Se eligió en base a lograr un equilibrio entre una alta velocidad de catálisis y un aumento de la sensibilidad del ensayo, teniendo en cuenta además, la posible influencia de actividades enzimáticas colaterales al ensayo, como la actividad ATPásica, que podrían degradar el sustrato incluso a velocidades más altas que la propia adenilato ciclasa.

TIEMPO DE INCUBACION.- La cinética para la enzima del adulto farato se representa en la fig. 17 y la de la enzima de la cabeza del adulto en las fig. 18, 19. En este último caso se utilizaron también los sistemas regeneradores de ATP PEP/piruvato quinasa (PEP 2.6 mM, piruvato quinasa 80 $\mu\text{g/ml}$) y creatina fosfato/creatina quinasa (creatina fosfato 5 mM, creatina quinasa 156 $\mu\text{g/ml}$) con resultados inciertos, lo cual nos hizo desistir de su utilización en el ensayo, ya que, el comportamiento del sistema regenerador resultaba en cierta medida perjudicial para el ensayo y sólo era efectivo a tiempos largos. Tomando tiempos de ensayo de 5 min e incluso de 10 min, la respuesta en ausencia de sistema regenerado es aceptable. Como se demostrará más adelante la no linealización de las cinéticas ha de ser achacada fundamentalmente a una pérdida de actividad por desactivación térmica más que a una fal-

ta de sustrato, ya que es más notable la no linealidad cuando la enzima se ensaya en condiciones basales que con la enzima activa da, hecho que de ser debido a una falta de sustrato debería de suceder en el sentido inverso. Por último, si además tenemos en cuenta que el mayor porcentaje de nucleotido como producto de de gradación del ATP lo constituye el AMP, los sistemas regeneradores empleados resultarían ineficaces.,

CONCENTRACIONES OPTIMAS DE ACTUACION DE ALGUNOS COFACTORES.- Co-
mo norma para poder interpretar las distintas Figuras y tablas
que en apartados sucesivos se expondrán han de tomarse como con-
centraciones estandar de los principales cofactores utilizados,
a menos que se especifique lo contrario, las siguientes:

Mg ²⁺	=	MgCl ₂	10 mM
Mn ²⁺	=	MnCl ₂	1 mM
F ⁻	=	NaF	10 mM
ADENOSINA	=		1 mM
OCTOPAMINA	=		1 mM
GTP	=		0.1 mM
GppNHp	=		0.1 mM
NaN ₃	=		1 mM

El resto de las condiciones del ensayo fueron especifi
cadas en su momento.

3.1.1.2. ENSAYO POR COMPETENCIA DE UNION ESPECIFICA

En un intento de utilización de los métodos descritos
para valorar el cAMP por ensayos de competencia de unión especi
fica (82, 432, 433, 450-455), teniendo en cuenta las aplicaciones
que de las mismas se habian hecho a la determinación de la acti-

vidad de la adenilato ciclasa (435, 456) se pretendió ajustar las condiciones de ensayo utilizando para la valoración del cAMP una proteína propia del insecto que se había mostrado con una alta capacidad de unión específica para el cAMP.

La enzima se obtuvo de las cabezas del insecto adulto después de unos pasos sencillos de purificación utilizándose por norma general el preparado procedente del Biogel HTP previa diálisis con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C) con 10 mM de 2-mercaptoetanol.

La linealización de la curva estandar realizada según el procedimiento de Albano y col (436) puede verse en la fig. 20.

Aunque el método se presentaba en un principio como altamente prometedor, la experiencia confirmó que sólo puede ser utilizado en determinadas condiciones, ya que existen muchos elementos posibles de interferencia para el ensayo de unión del cAMP. El ATP y todos los productos de degradación procedentes del mismo, presentes en el ensayo de adenilato ciclasa, puede competir con la unión del nucleótido cíclico y por lo que resulta imprescindible, una dilución de la muestra del ensayo con los errores que esto siempre encierra. Además la influencia de los distintos cofactores del ensayo de la ciclasa debe de ser siempre contrastada mediante ensayos blanco. Por último, cuando se ensaya la adenilato ciclasa solubilizada con detergentes, resulta imposible realizar un ensayo de unión de cAMP fiable, ya que las alteraciones provocadas por la presencia del detergente son prácticamente insoslayables.

De todo esto se deduce que el método no es recomendable para valorar la adenilato ciclasa, aunque si lo puede ser para determinar los niveles del nucleótido cíclico en tejidos, previa purificación parcial del mismo.

147

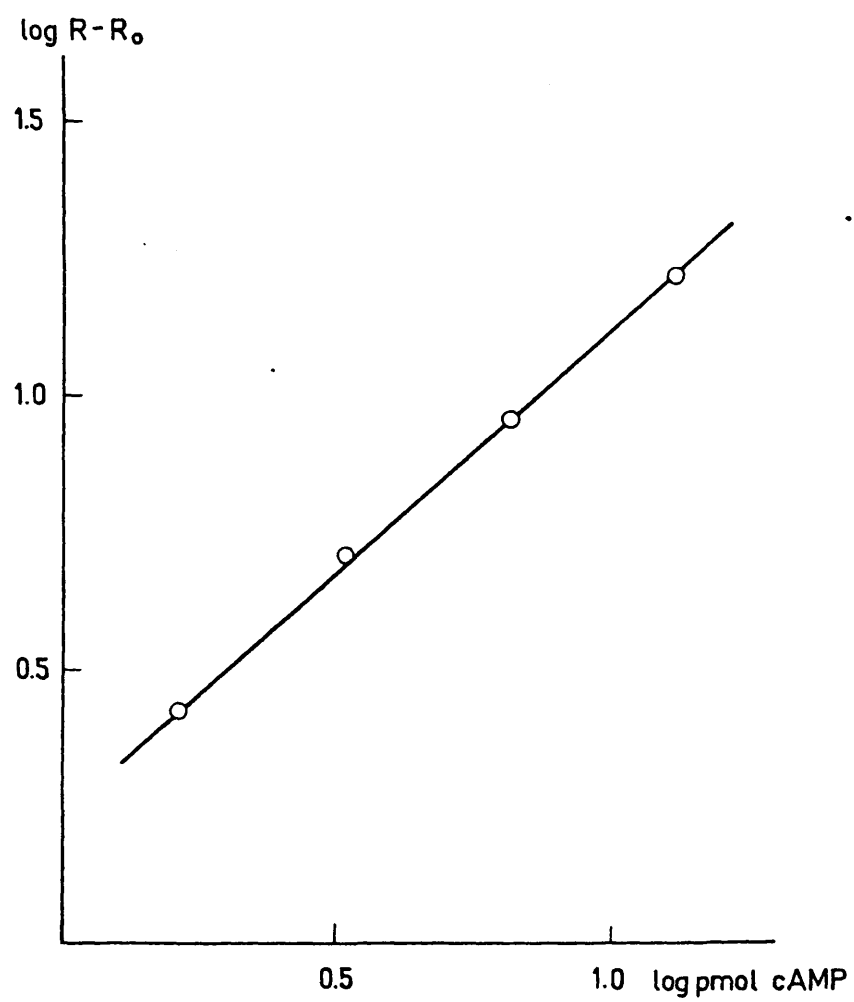


FIGURA 20. Curva estandar para el ensayo de cAMP.

3.1.2. PROTEINA RECEPTORA DE cAMP

Se ha estudiado la capacidad de la proteína receptora de cAMP para unir el nucleótido mediante distintos procedimientos. Por una parte se comparó la unión a pH 4.5 (acético-acetato) y pH 8.2 (Tris-HCl). Por otra parte se valoraron los métodos de determinación cuantitativa de la misma según el procedimiento de Gilman (433) que utiliza filtros Millipore HAWP y el procedimiento de Rosen (435) que emplea filtros Whatman GF/C. Los resultados pueden verse en la tabla 14.

TABLA 14: Ensayo de la capacidad de unión de cAMP de la proteína receptora de cAMP parcialmente purificada.

<u>FILTRO</u>	<u>pH</u>	<u>cpm cAMP unido</u>
MILLIPORE HAWP	4.5	1 354
MILLIPORE HAWD	8.2	473
WHATMAN GF/C	4.5	2 691
WHATMAN GF/C	8.2	1 536

De los resultados se desprende que el método habitualmente utilizado presenta unos valores de recuperación más aceptables para el cAMP unido a la proteína, valores que en ningún caso pueden achacarse al fondo del ensayo, ya que, tanto en un caso como en otro es prácticamente nulo.

Todos los experimentos con esta enzima fueron realizados con un tiempo de incubación de 45 min a 0°C, tiempo que se determinó óptimo para el equilibrio de unión como se observa en la fig. 21

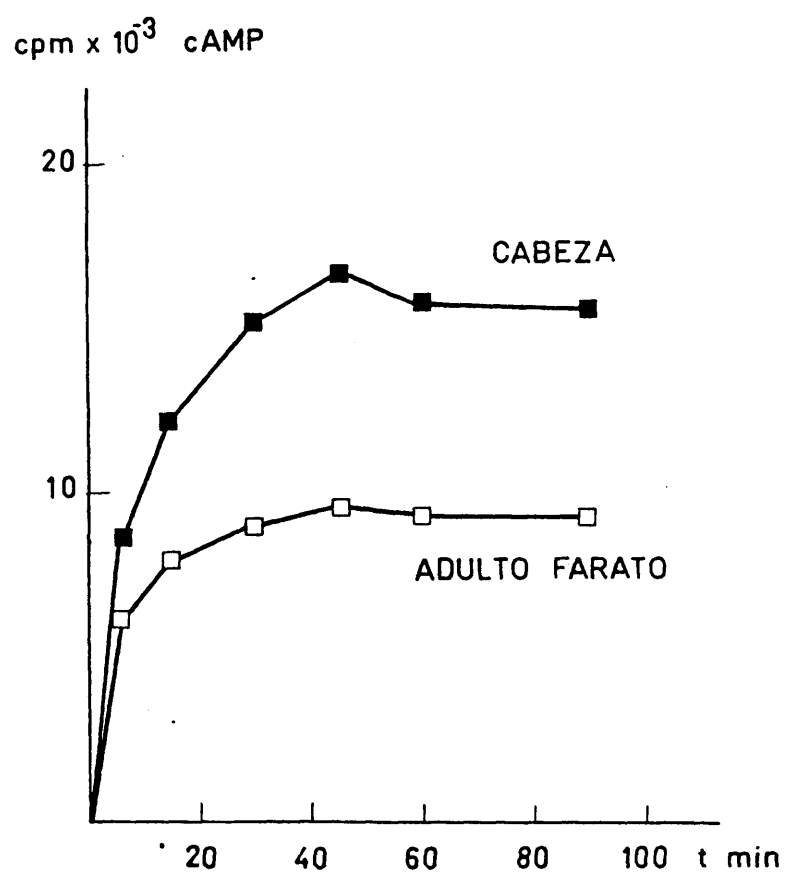


FIGURA 21. Unión del cAMP a la proteína receptora en función del tiempo.

3.2. GUANILATO CICLASA

Los estudios realizados sobre la guanilato ciclasa del díptero Ceratitis capitata quedan resumidos en la tabla 15.

TABLA 15: Actividad de guanilato ciclasa en distintas fracciones de homogeneizados de adulto farato. Los datos se expresan en pmol cGMP/15min/mg proteína.

	<u>SOBRENADANTE</u>			<u>SEDIMENTO</u>
	37 000 g	37 000 g	1 500 g	1 500 - 37 000 g
	<u>ENSAYO 1</u>	<u>ENSAYO 2</u>	<u>ENSAYO 3</u>	<u>ENSAYO 4</u>
CONTROL	37	124	78	84
+ ETANOL 8% (v/v)	14	29	17	-
+ TRITON X-100 1% (p/v)	52	-	201	289
+ ETANOL 8% (v/v) + TRITON X-100 1% (p/v)	17	69	17	82

En esta tabla se observan tres resultados fundamentales. El primero de ellos nos muestra que la actividad se encuentra distribuida entre la fracción soluble y particulada. Aunque no se ha llegado a comprobar si la actividad permanece en el sobrenadante de ultracentrifugación a 105 000 g, dato que confirmaría que la proteína es realmente soluble, resulta significativo el resultado si se compara con los resultados obtenidos con la adenilato ciclasa en las mismas condiciones. Una segunda característica es la respuesta positiva de la guanilato ciclasa al Triton X-100. Esta propiedad la diferencia claramente de la adenilato ciclasa, la cual se inhibe por detergentes no iónicos. La activación por Triton X-100 se ha observado en todas las preparaciones de guani

lato ciclasa procedente de insectos (324, 399) así como en múltiples preparaciones de la enzima de mamíferos (400, 457-460). Resulta significativo el hecho de que la activación por el detergente sea superior cuanto mayor es el porcentaje de fracción particulada en la preparación, resultado que ha sido también observado por otros investigadores (400).

Por último, es muy interesante el efecto inhibidor que ejerce el etanol sobre la actividad enzimática, efecto que parece específico de la guanilato ciclasa, ya que tal efecto no ha sido observado en la adenilato ciclasa. A este respecto resulta interesante el hallazgo de Hunt y col (461) quienes demostraron un efecto similar del etanol sobre los niveles de cGMP "in vivo". En cualquier caso es necesario proseguir la caracterización de la enzima a todos los niveles, ya que estos datos preliminares no hacen más que confirmar su presencia y esbozan tan sólo una posible línea de investigación futura.

3.3. PROTEINA RECEPTORA DE cAMP

3.3.1. PURIFICACION

La presencia de una proteína con capacidad de unión de cAMP sin actividad de proteína quinasa fue detectada por primera vez en los trabajos conducentes a la obtención de preparados parcialmente purificados de las proteínas quinasas del insecto. Las investigaciones sobre la caracterización de esa proteína receptora de cAMP se prosiguieron aquí con vistas a obtener un preparado más puro que pudiera ser utilizado para el ensayo de los niveles de cAMP y de la actividad de adenilato ciclasa por el método de competencia de unión específica.

Al principio se estudió si era posible obtener una fracción proteica útil a tal fin sólo mediante el empleo de pasos de

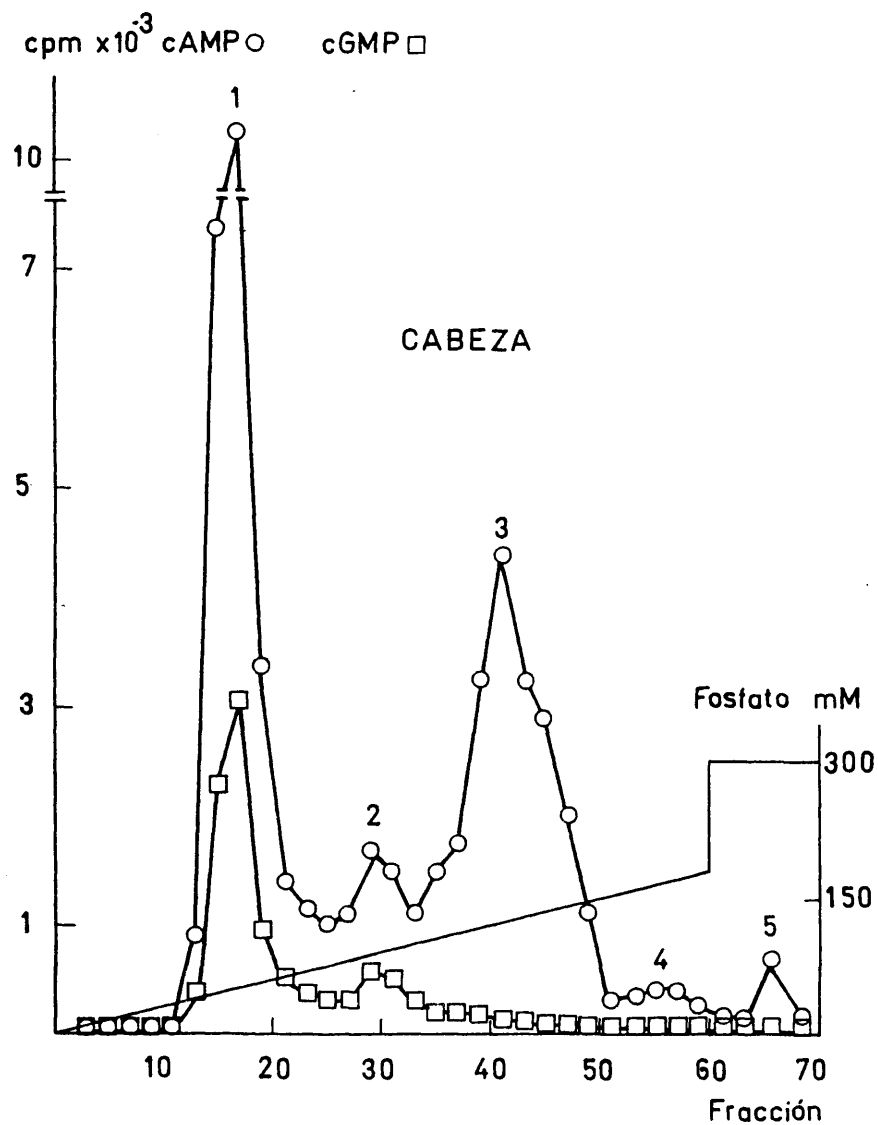


FIGURA 22. Perfil de elución de la cromatografía en Biogel HTP de las proteínas que unen nucleótidos cíclicos, procedentes de la cabeza del adulto.

purificación simples, como la precipitación ácida a pH 4.8 y la precipitación con sulfato amónico. Aunque estos procedimientos efectivamente aumentan la actividad específica de unión del cAMP resultan poco aconsejables, ya que no permitían separar la proteína receptora de las proteínas quinasas que también unen nucleótidos cíclicos. Fue necesario por tanto introducir una etapa cromatográfica para lograr dicha separación. El soporte que ofreció los mejores resultados fue el hidroxipatito comercializado con el nombre de Biogel HTP. La elución se realiza en gradiente de concentración de fosfato. Uno de los resultados preliminares pueden verse en la fig. 22. La actividad de proteína quinasa fue determinada tanto en presencia de cAMP como de cGMP y los resultados de estos ensayos pueden verse referidos exclusivamente a los máximos de actividad en la tabla 16.

TABLA 16: Actividad de proteína quinasa en los picos de la fig. 22 expresada como cpm de ^{32}P incorporados en 200 μg de histonas totales de timo de ternera por 100 μl de eluido de columna.

	<u>CONTROL</u>	<u>+ cAMP</u>	<u>+ cGMP</u>
PICO 1	0	0	0
PICO 2	5 900	9 200	7 700
PICO 3	12 500	33 400	21 500
PICO 4	2 800	4 100	3 600
PICO 5	1 800	3 500	200

Resulta notoria la absoluta carencia de actividad de proteína quinasa en el primer pico del desarrollo cromatográfico, lo que confirma que la proteína del pico 1 no es una proteína quinasa, lo cual no ocurrió con los otros picos los cuales en ma

yor o menor medida poseen cierta actividad fosforilante.

3.3.2. ESPECIFICIDAD

Con objeto de determinar si realmente la proteína receptora de cAMP era realmente específica para el cAMP. Se preparó un ensayo estandar en el que se hizo competir 1 pmol de (8-³H)cAMP frente a 1 pmol de otros nucleótidos y nucleosidos no marcados. Los resultados se reúnen en la tabla 17.

TABLA 17: Competencia en la unión a la proteína receptora entre el (8-³H)cAMP y distintos nucleótidos y nucleosidos.

<u>NUCLEOTIDO - NUCLEOSIDO (1 pmol)</u>	<u>(8-³H)cAMP UNIDO</u>
CONTROL	100
cAMP	45
cGMP	96
cIMP	81
cCMP	103
cUMP	103
cTMP	111
ATP	104
GTP	103
ADP	108
AMP	100
ADENOSINA	103

De los datos resulta evidente que la proteína une específicamente cAMP y que en orden de importancia es el cIMP el único que parece unirse en cantidad apreciable. Como era de esperar

la presencia de 1 pmol de cAMP no marcado reduce en un 50% la unión del cAMP marcado, ya que se produce una disminución mitad de la actividad específica.

Con objeto de mejorar la resolución de la proteína receptora, disminuir el tiempo de elución y la dilución de la muestra, se eligieron las condiciones de elución que fueron descritas en el apartado de materiales y métodos. Con estas condiciones se obtuvieron los resultados de actividad receptora de cAMP que se ven en las figs. 23 y 24, en las que se comparan los patrones de desarrollo de las proteínas de la larva y de las cabezas del insecto adulto. Se observan aquí algunas diferencias significativas en los volúmenes de aparición del pico de ambas proteínas receptoras cuyos máximos aparecen en larvas en la fracción 12 y en cabezas en la fracción 18. Estas diferencias fueron ratificadas por sus patrones de elución en Sephadex G-200. La fig. 25 muestra que la proteína procedente de cabeza posee un peso molecular superior a la proteína de larva. Esto podría indicar que son proteínas diferentes o bien, que se trata de la misma proteína con estructuras oligoméricas diferentes. Comparando las posiciones de elución con la de otras proteínas de peso molecular conocido, se puede afirmar que la proteína de cabeza posee aproximadamente un peso molecular doble del de la proteína de larva.

3.3.3. SIGNIFICACION BIOLOGICA

En el gráfico de elución de la fig. 22 se puede observar que la proteína del pico 1 también une cGMP en ausencia de cAMP, en una proporción relativa cGMP unido/cAMP unido mucho más alta que la proteína del pico 3.

Por otra parte la relación para el pico 2 es similar a la del pico 1. Estudios posteriores han confirmado que la proteína del pico 2 corresponde a una proteína quinasa dependiente

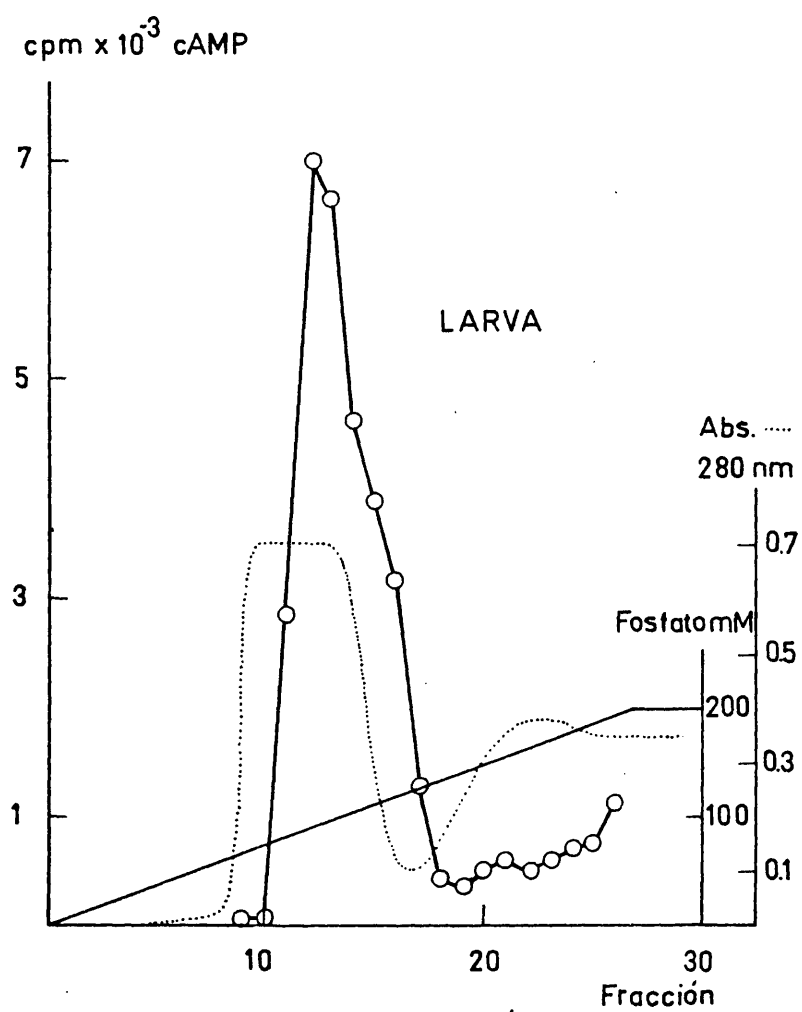


FIGURA 23. Purificación en Biogel HTP de la proteína receptora de cAMP.

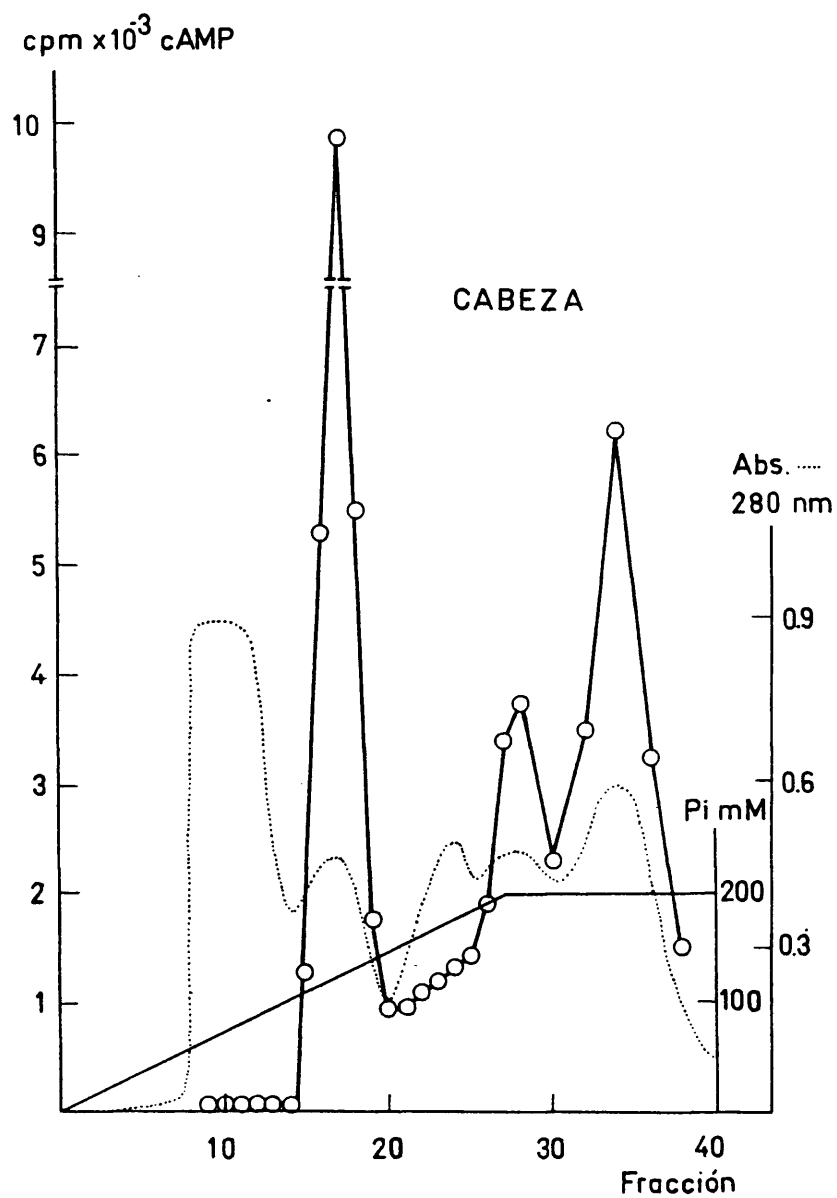


FIGURA 24. Purificación en Biogel HTP de la proteína receptora de cAMP.

158

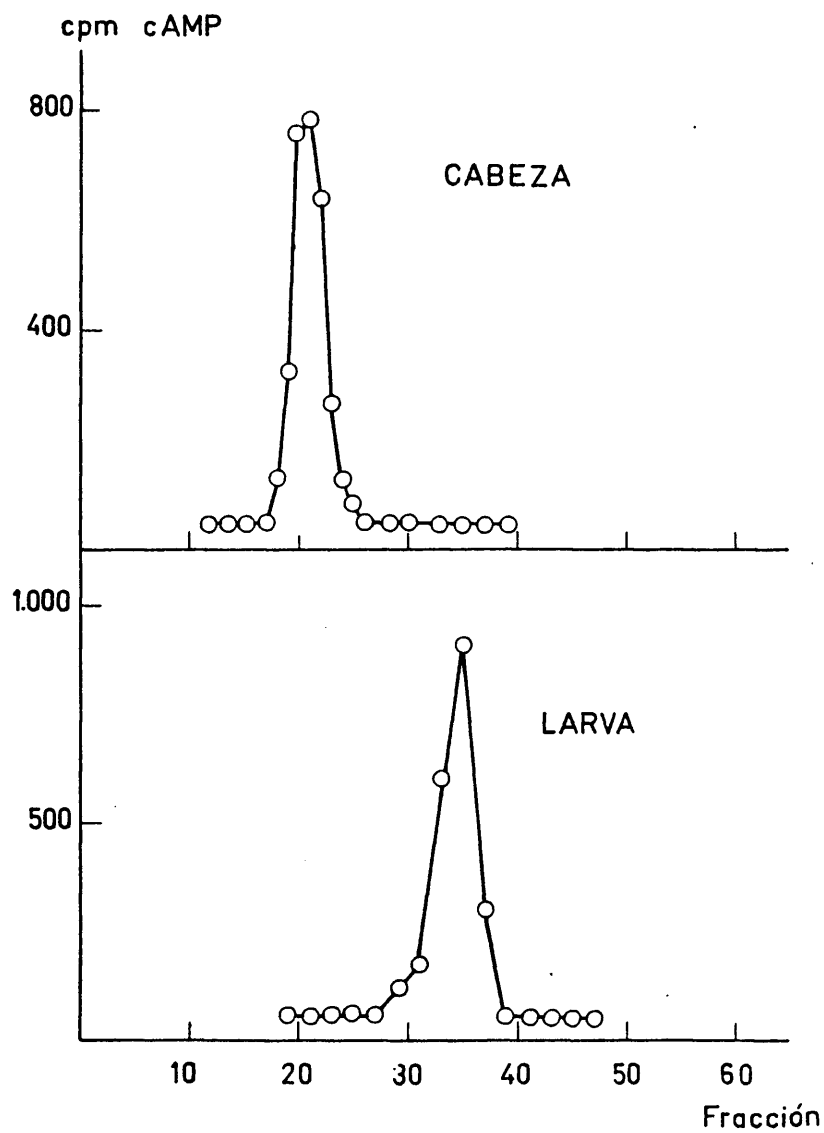


FIGURA 25. Purificación en Sephadex G-200 de la proteína receptora de cAMP.

de cGMP parcialmente enmascarada por la actividad de proteína quinasa dependiente de cGMP parcialmente enmascarada por la actividad de proteína quinasa dependiente de cAMP procedente del pico 3. A su vez el pico 3 como se comprueba en la fig. 24 se puede desdoblar en dos picos con actividad de proteína quinasa dependiente de cAMP.

Todo esto nos introduce en el problema de la funcionalidad biológica de estas proteínas. En un principio se pensó que la proteína receptora podría corresponder a la subunidad reguladora de una proteína quinasa dependiente de cAMP. Según esta hipótesis sería explicable que la enzima se encontrara en dos formas moleculares que podrían corresponder a estructuras tipo R_2 y R, lo que daría sentido a las diferencias en los pesos moleculares observados en las proteínas de la larva y la cabeza. Sin embargo, debido a la falta de concordancia entre las relaciones cAMP unido/cGMP unido de la proteína quinasa dependiente de cAMP y la proteína receptora se podría argüir que no pueden ser proteínas idénticas.

A pesar de esto no hay que perder de vista el hecho de que no necesariamente la subunidad reguladora de la proteína quinasa dependiente de cAMP se ha de comportar igual cuando forma parte de la holoenzima, que cuando está separada de la misma.

Estudios realizados con una proteína quinasa independiente de nucleótidos cíclicos que parece ser la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP, sugieren que la proteína receptora de cAMP podría interaccionar con la subunidad catalítica formando un complejo inactivo, lo que estaría de acuerdo con la interpretación de que realmente la proteína receptora no sería otra cosa que la subunidad reguladora separada por algún motivo fisiológico o no de la subunidad catalítica de alguno de los tipos de proteína quinasa dependiente de cAMP presen

tes en el insecto.

El mismo método seguido para la caracterización de la proteína receptora de cAMP en el insecto ha sido utilizado para caracterizar las proteínas con esa actividad en corazón de conejo. Sorprendentemente se ha encontrado un patrón de elución similar, detectándose también la presencia de una proteína capaz de unir cAMP y sin actividad de proteína quinasa. Esto podría significar que, en general, en la célula la proteína reguladora podría encontrarse en mayor o menor medida, separada de la subunidad catalítica de la proteína quinasa dependiente de cAMP, en función del grado de actividad de la enzima, siendo posible mediante nuestro método separar ambas actividades. A conclusiones parecidas, aunque utilizando procedimientos radioinmunológicos llegan Steiner y col (462). También han aparecido algunos trabajos en los que se caracterizan parcialmente algunas proteínas que unen nucleótidos cíclicos y que tampoco presentan actividad de proteína quinasa (435, 463-466). En algunos de estos casos parece evidente que tales proteínas son las propias subunidades reguladoras de las holoenzimas de proteínas quinasa dependientes de nucleótidos cíclicos (463, 464).

3.4. ADENILATO CICLASA

3.4.1. ADULTO FARATO

Cuando se inició la caracterización de la adenilato ciclasa del insecto se eligió como material básico de trabajo el estadio de adulto farato. En concreto, se utilizó el adulto farato de 5 días, que se caracteriza morfológicamente por presentar los ojos de color naranja.

Con este material se pusieron a punto los métodos de homogeneización y de preparación de fracciones particuladas altamente enriquecidas en actividad de adenilato ciclasa.

El primer aspecto que se puso de manifiesto fue que si la homogeneización se realizaba mediante homogeneizadores con émbolos de teflón, no se encontraba actividad detectable en el sobrenadante de centrifugación de 37 000 g. Esto demostró que la enzima se encontraba completamente ligada a la fracción insoluble, respondiendo al comportamiento clásico de la enzima de células eucariontes. La utilización de métodos de homogeneización por aspas implica la obtención de partículas de pequeño tamaño y es necesario recurrir a la ultracentrifugación para sedimentar la actividad. No es pues aconsejable este método de homogeneización.

Para obtener fracciones particuladas más ricas en contenido de adenilato ciclasa fue necesario recurrir a la utilización de técnicas de centrifugación diferencial y centrifugación en gradiente de densidad.

Todos los experimentos que se han llevado a cabo con el adulto farato utilizan como fuente de enzima la fracción particulada sedimentable entre 2 000 - 37 000 g purificada en gradiente de densidad en la interfase 0-1.5 M de sacarosa.

3.4.1.1. EFFECTO DE LOS CATIONES DIVALENTES

El primer resultado que llama la atención en este aspecto es que la enzima no presenta actividad alguna si no se encuentra presente en el medio de incubación un catión divalente como Mg^{2+} o Mn^{2+} . El Ca^{2+} y el Zn^{2+} son totalmente inefectivos para la catálisis.

En las figs. 26 y 27, se representa la variación de la actividad enzimática en función de la concentración del Mg^{2+} o del Mn^{2+} manteniendo fija la concentración de ATP. La actividad que manifiesta la enzima en presencia de uno y otro catión es totalmente diferente, no sólo en magnitud, sino también en lo que respecta a las concentraciones óptimas de ambos cationes. La re-

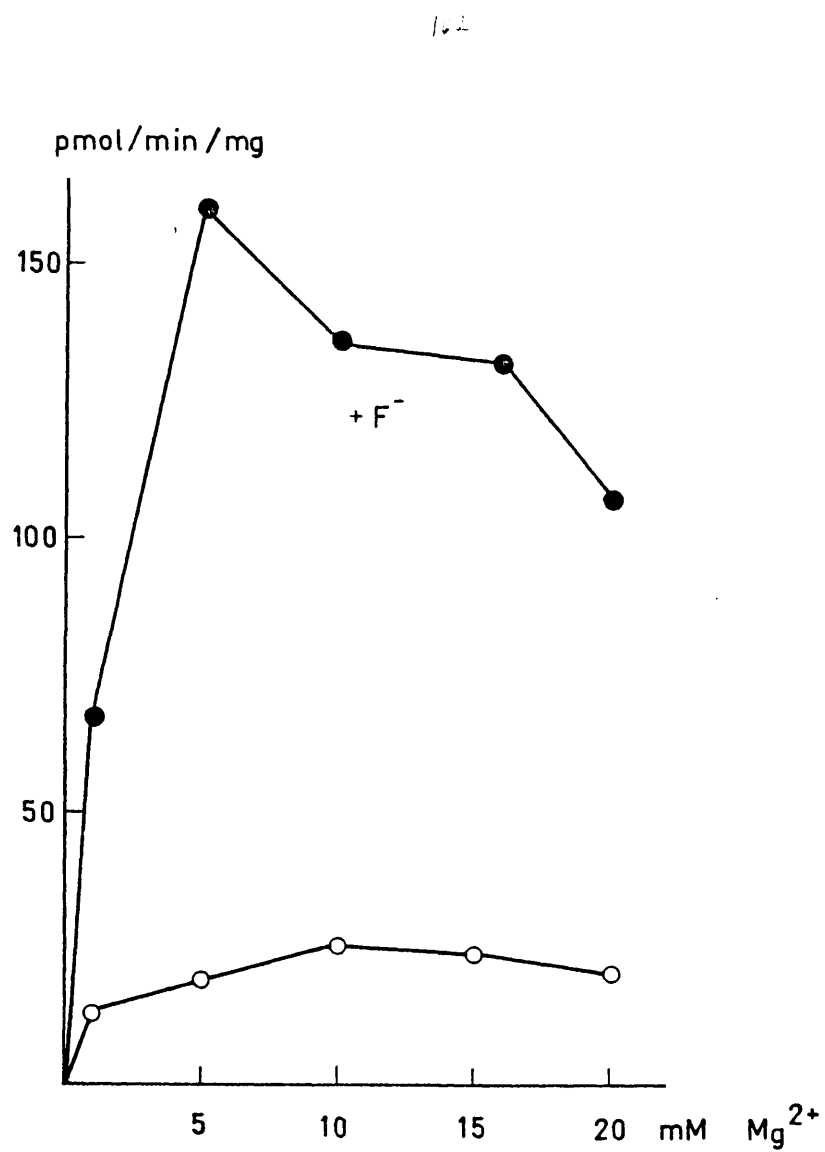


FIGURA 26. Influencia del MgCl_2 sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia y ausencia de NaF 10 mM. La actividad se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

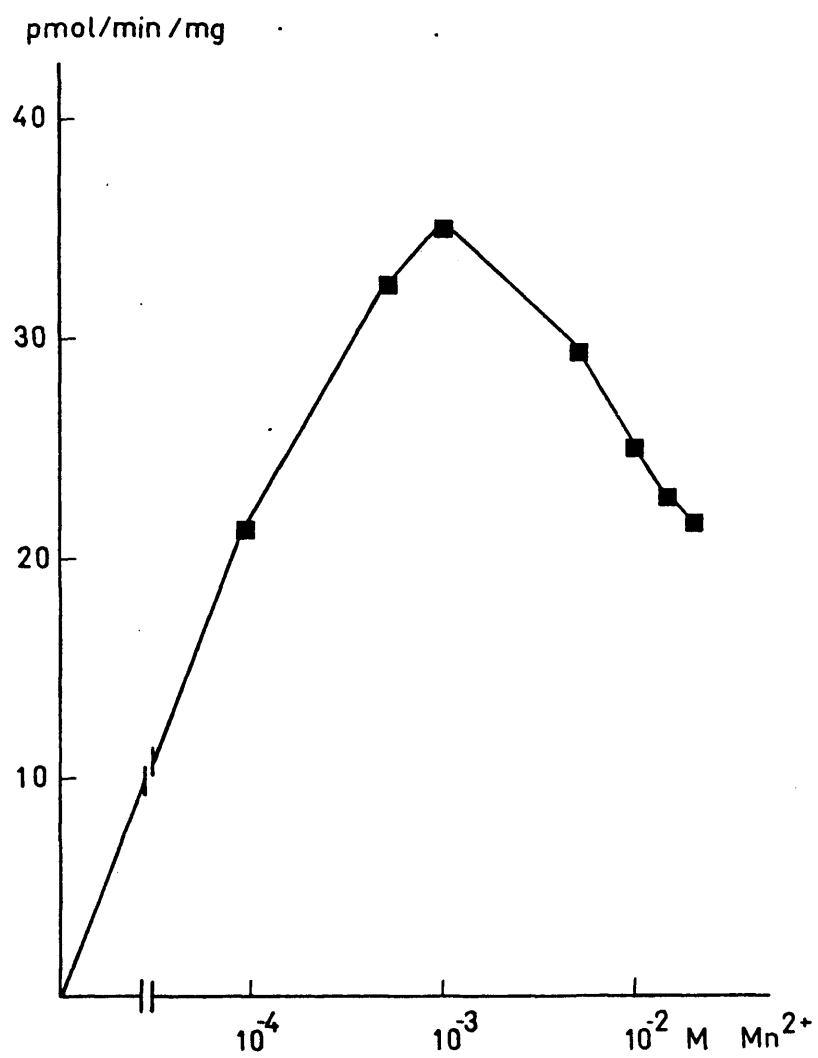


FIGURA 27. Influencia del $MnCl_2$ sobre la actividad de adenilato ciclasa. La actividad se expresa en $pmol$ cAMP/min/mg proteína.

lación de actividades máximas en presencia de Mn^{2+} y Mg^{2+} oscila entre 1.5 y 2.5. Con la particularidad de que la concentración óptima de Mg^{2+} es 10 veces superior a la de Mn^{2+} . Se puede decir según esto que la enzima en cuanto a su actividad basal es dependiente de Mn^{2+} . Se conocen bastantes ejemplos de adenilato ciclasas que presentan un comportamiento similar al aquí descrito; la enzima de Saccharomyces cerevisiae (467, 468), Neurospora crassa (101, 102), Trypanosoma cruzi (63), Bombyx mori (397) y distintos tejidos de mamíferos (51, 74).

Si se compara la concentración de catión necesaria para lograr la actividad máxima, Mg^{2+} 10 mM y Mn^{2+} 1 mM, con la concentración de ATP del ensayo 0.05 mM resulta obvio que se necesita un gran exceso de metal por encima de lo que sería de esperar si sólo se utilizase para formar el complejo Me^{2+} -ATP, verdadero sustrato de la enzima. Esto nos introduce en el tan debatido problema de la existencia de un posible sitio regulador para los metales distinto del centro activo. Si se tienen en cuenta las constantes de disociación de los complejos que forman el Mg^{2+} y el Mn^{2+} con el ATP, no cabría esperar una diferencia de un orden de magnitud en las concentraciones efectivas del metal si el efecto activador se debiera a una disminución de la concentración de ATP libre, el cual según se ha comprobado se comporta como un potente inhibidor competitivo de la enzima.

Parece evidente a la vista de estos resultados, que realmente ha de existir algún sitio de activación para los metales, distinto del centro activo. Este sitio alostérico poseería una mayor afinidad para el Mn^{2+} al menos de un orden de magnitud superior a la del Mg^{2+} .

3.4.1.2. EFECTO DEL FLUORURO

Dado que el ion fluoruro es el mejor activador conoci

165

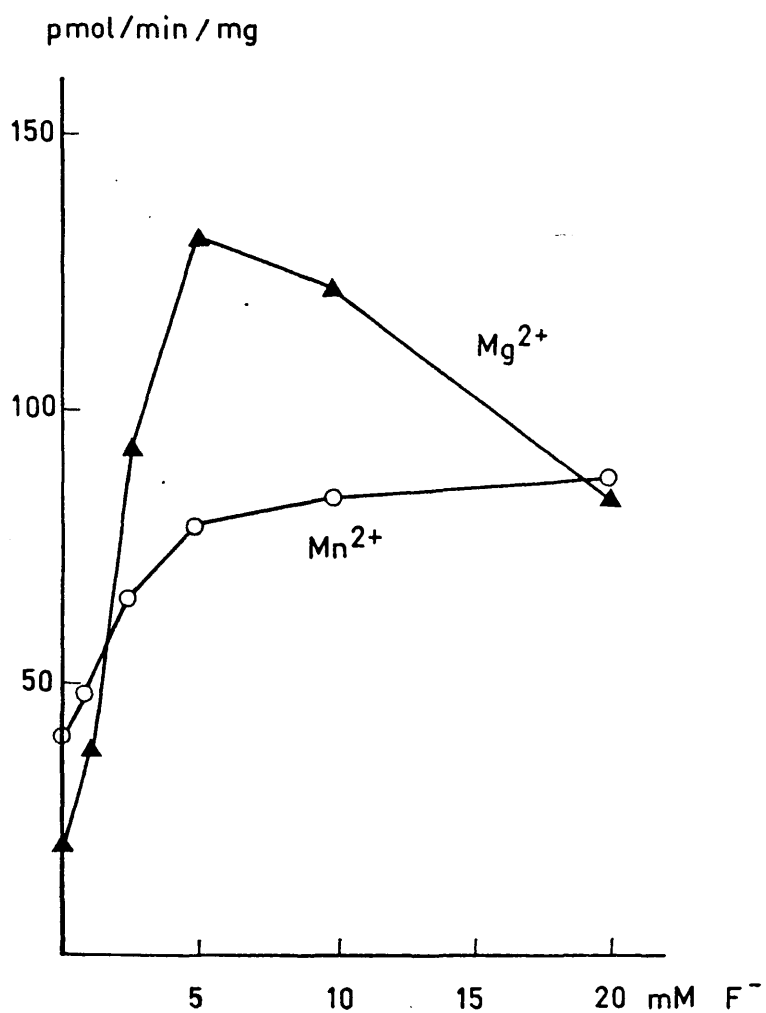


FIGURA 28. Influencia del NaF sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de $MgCl_2$ 10 mM o $MnCl_2$ 1 mM. La actividad se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

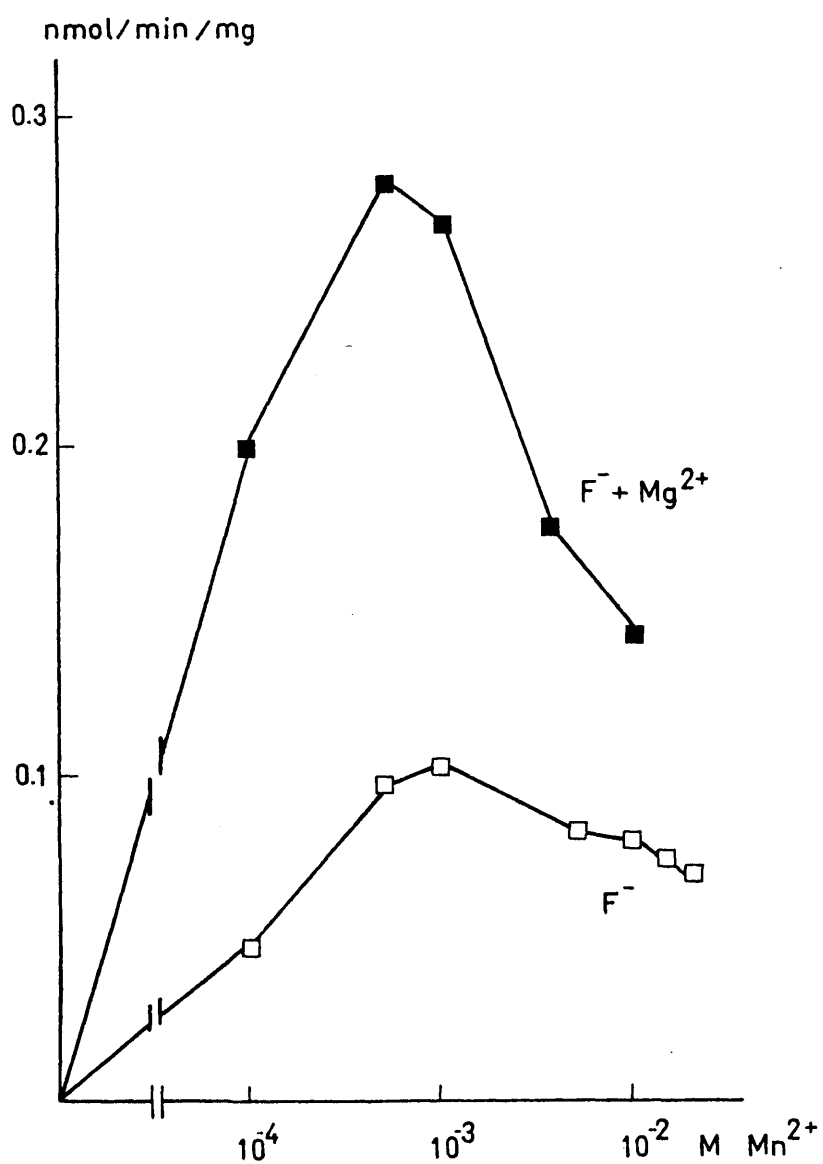


FIGURA 29. Influencia del $MnCl_2$ sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de distintos cofactores. La actividad se expresa en nmol cAMP/min/mg proteína.

do para la enzima se estudió el comportamiento de este ion en nuestro sistema. La concentración óptima de fluoruro se estableció mediante dos procedimientos. En el primero, se mantiene fija la concentración del catión, bien sea Mg^{2+} o Mn^{2+} (fig. 28) y en la segunda, se hace variar la concentración del catión manteniendo fija la concentración del fluoruro (figs. 26 y 29). De los resultados obtenidos se deduce que el fluoruro presenta su máxima capacidad activadora en el intervalo comprendido entre 5 y 10 mM. Este valor es perfectamente coincidente con los valores encontrados en otros tejidos (51).

Aparte de la estimulación conseguida con el fluoruro, hay dos aspectos que destacan sobre el resto. El primero se refiere a la inversión de valores de actividad obtenidos en presencia de Mn^{2+} y Mg^{2+} comparados con las actividades basales. En tanto que, el F^- activa sólo dos veces la actividad basal obtenida con Mn^{2+} , activa 6 veces la adenilato ciclasa en presencia de Mg^{2+} . El valor absoluto obtenido con F^- y Mg^{2+} es casi dos veces superior al que se obtiene con F^- y Mn^{2+} . El segundo aspecto es, si cabe, más sorprendente que el primero, ya que la presencia conjunta de Mn^{2+} y Mg^{2+} favorece enormemente la activación por fluoruro, de tal suerte que se consigue una actividad algo superior incluso a la suma de las actividades obtenidas con Mg^{2+} y Mn^{2+} de forma independiente. Este efecto no puede atribuirse a un suplemento de la concentración del catión, ya que a la concentración suma que sería de 11 mM, ni el Mg^{2+} ni el Mn^{2+} son capaces por sí solos de favorecer el grado de estimulación que se consigue con la mezcla. Tampoco pueden atribuirse a un incremento de la actividad basal en presencia de ambos cationes, ya que dicha actividad basal apenas si aumenta por encima del valor obtenido con Mn^{2+} cuando se hayan presentes tanto éste como el Mg^{2+} .

La interpretación del resultado se antoja compleja, ya

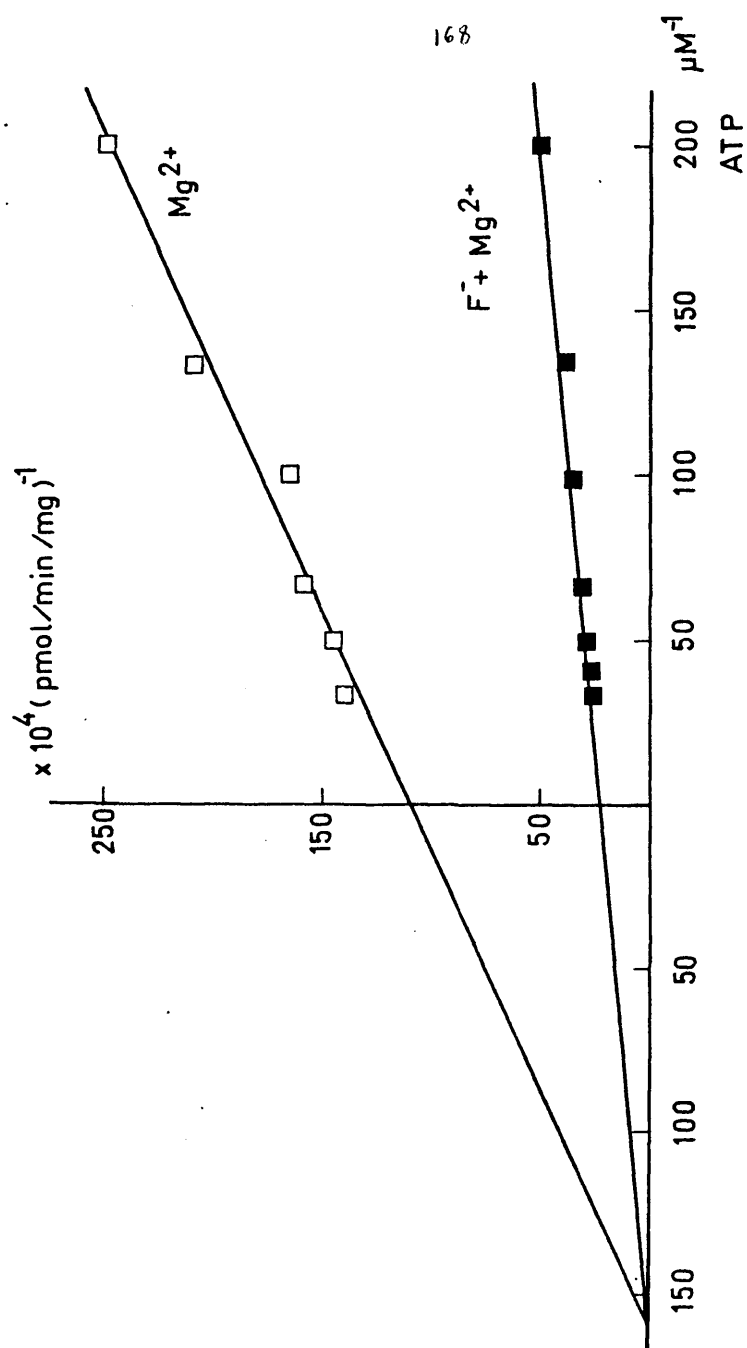


FIGURA 30. Representación de Lineweaver-Burk para la actividad de la adenilato ciclasa frente a ATP en presencia de MgCl_2 10 mM con o sin NaF 10 mM. La actividad se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

que hasta el momento no se ha podido aportar ningún dato fiable acerca de los mecanismos de actuación del fluoruro. Los datos aquí aportados abogan a favor de una clara dependencia del catión en el proceso de activación, lo cual podría indicar que el fluoruro actuaría en estrecha concomitancia con un metal divalente, prefiriendo a tal fin el ion Mg^{2+} . Podría suceder que el verdadero activador no fuese como tal el ion fluoruro sino algún complejo de F^- y Mg^{2+} . El efecto sinérgico del Mg^{2+} y el Mn^{2+} podría explicarse desde el punto de vista de la existencia de un sitio catiónico distinto del centro activo, ya que de existir éste podría darse una situación mucho más favorable si el Mn^{2+} estuviese ocupando ese sitio que si lo estuviese ocupando el Mg^{2+} . Al mismo tiempo si el F^- para su actuación "prefiere" el ion Mg^{2+} ambas acciones se complementarían en presencia de los dos cationes. Para completar en parte el estudio de la acción del fluoruro se llevó a cabo un estudio cinético de la concentración de sustrato en presencia de $MgCl_2$ (10 mM) con y sin NaF (10 mM). Los resultados se observan en la fig. 30. Según se aprecia en la misma, el fluoruro parece actuar exclusivamente sobre la V_{max} sin modificar la afinidad del sustrato por la enzima. Un resultado similar fue observado por Morishima (397) con la adenilato ciclasa del cuerpo graso del Bombyx mori.

3.4.1.3. EFFECTO DEL Ca^{2+}

Para determinar los cambios de actividad producidos por el Ca^{2+} sobre la actividad de la adenilato ciclasa, se eligieron como estados de referencia, los valores de actividad obtenidos en presencia de fluoruro 10 mM; con cada uno de los cationes Mn^{2+} 1 mM y Mg^{2+} 10 mM respectivamente. Se eligió esta situación ya que se comprobó desde un principio que el Ca^{2+} ejercía un potente efecto inhibitor sobre las actividades basales, pero como

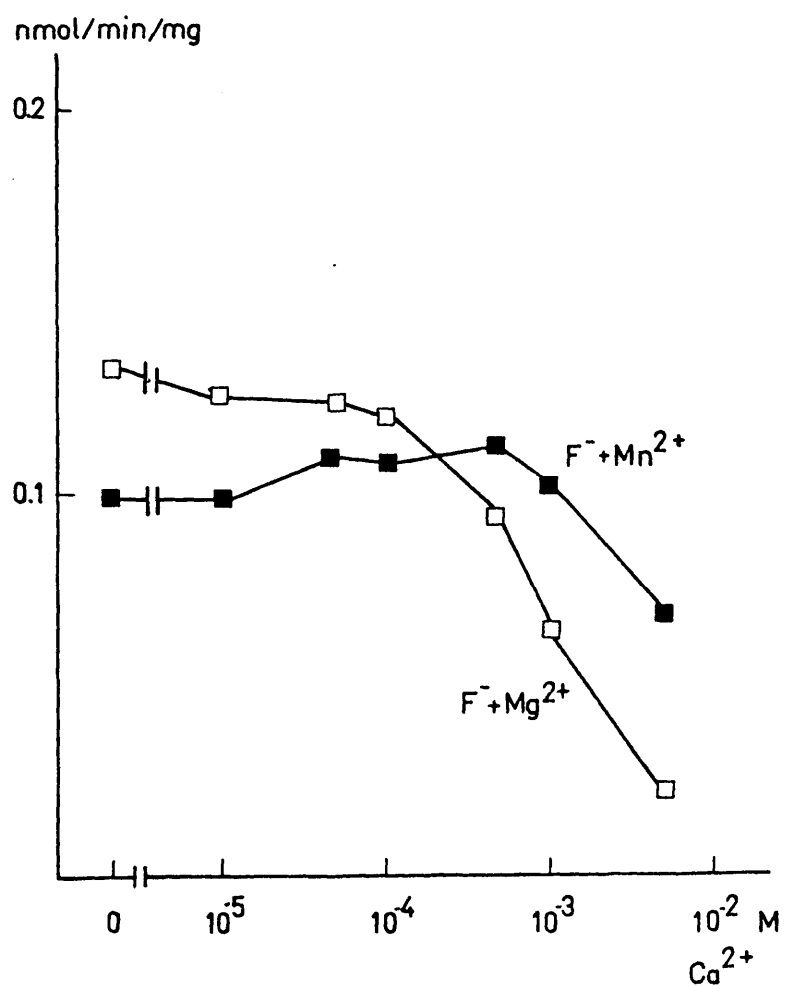


FIGURA 31. Efecto del CaCl_2 sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de distintos cofactores. La actividad se expresa en nmol cAMP/min/mg proteína.

éstas son bajas, sus efectos son más difíciles de evaluar en este caso que con la enzima activada. De cualquier forma como se ha comprobado una estrecha correlación entre los datos obtenidos en uno y otro caso, sirvan como ejemplo los valores expresados en la fig. 31. Resulta evidente a partir de estos datos que la inhibición es superior en presencia de Mg^{2+} que en presencia de Mn^{2+} . Resultados similares a estos se han observado en otras preparaciones de adenilato ciclasa (80, 82).

Es muy significativo el hecho de que la inhibición por Ca^{2+} en presencia de Mn^{2+} no sea verdaderamente efectiva hasta que la concentración de Ca^{2+} supera a la de Mn^{2+} . Este efecto se pudo comprobar fácilmente aumentando la concentración de Mn^{2+} en el ensayo, lo cual supuso un aumento de la concentración de Ca^{2+} para producir una inhibición equivalente a la anterior.

Estos resultados podrían interpretarse si tuviéramos en cuenta una posible competencia entre el Ca^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} por ese posible centro metálico alostérico de la enzima. Sería evidente según esto que el Mn^{2+} poseería la mayor afinidad para el mismo, seguido del Ca^{2+} y el Mg^{2+} . No hay que olvidar, sin embargo, que otra posible vía de interferencia del Ca^{2+} es sobre la formación del complejo Me^{2+} -ATP, originando un complejo Ca^{2+} -ATP inactivo como sustrato.

3.4.1.4. EFFECTO DEL EGTA Y EDTA

La influencia del EGTA y del EDTA sobre la actividad enzimática se estudió en base a demostrar algún posible efecto modulador provocado por bajas concentraciones de Ca^{2+} o algún otro metal divalente como ha sido propuesto por Morishima (397, 398). Los datos obtenidos se pueden ver reflejados en la tabla 18 y en la fig. 32.

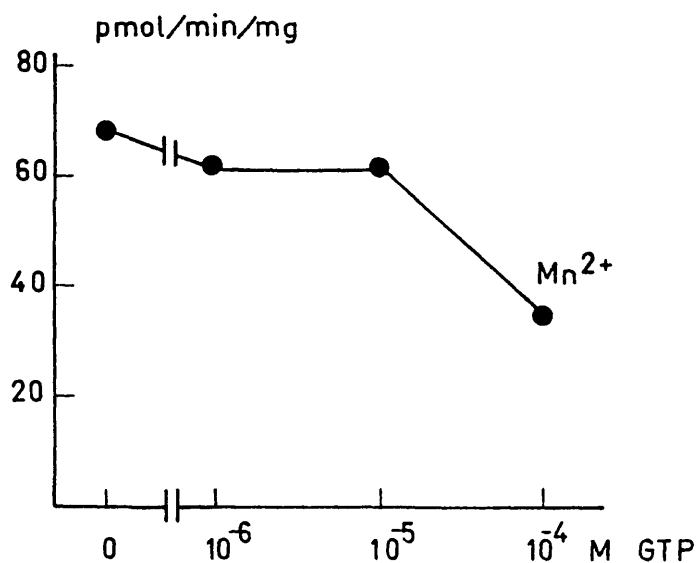


FIGURA 33. Efecto del GTP sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de MnCl_2 1 mM.

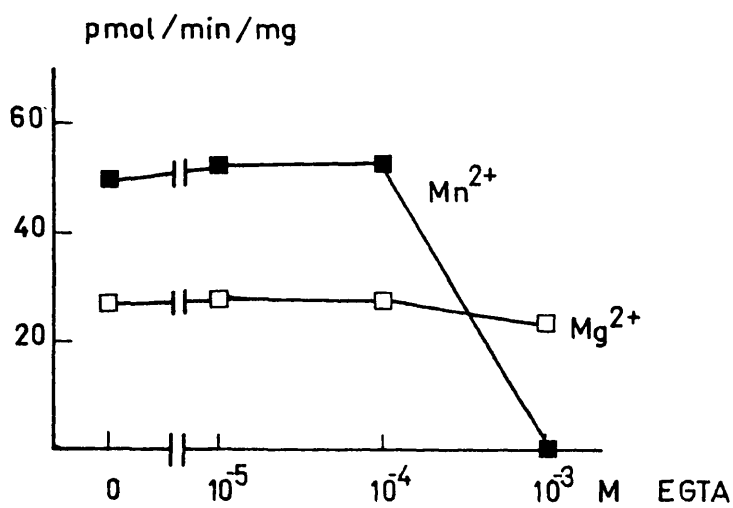


FIGURA 32. Efecto del EGTA sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de MgCl_2 10 mM o MnCl_2 10 mM.

TABLA 18: Efecto del EGTA y EDTA sobre la adenilato ciclasa del adulto farato ensayado bajo diferentes condiciones. El resultado se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

<u>ADICION</u>	<u>NADA</u>	<u>EGTA (1 mM)</u>	<u>EDTA (1 mM)</u>
MnCl ₂ 1 mM	51	0	0
MnCl ₂ 2 mM	-	65	63
NaF 10 mM + MnCl ₂ 1 mM	125	0	-
MgCl ₂ 10 mM	26	34	26
MnCl ₂ 1 mM + CaCl ₂ 1 mM	46	19	0
MgCl ₂ 10 mM + CaCl ₂ 1 mM	7	39	16

De los resultados obtenidos se deduce claramente que la acción inhibitoria ejercida por los agentes quelantes responde a una disminución efectiva del catión disponible para el ensayo. Así vemos que, en tanto que no afecta a la actividad en presencia de Mg²⁺ por ser la concentración de éste muy superior a las de EGTA o EDTA, reduce practicamente a cero la actividad en presencia de Mn²⁺ 1 mM. Cuando la concentración del Mn²⁺ se eleva a 2 mM el efecto inhibitor ya no se produce puesto que quedaría una concentración de 1 mM de Mn²⁺ libre. La relación de actividades en presencia de Ca²⁺ y agentes quelantes se puede explicar simplemente teniendo en cuenta las constantes de complejación del EGTA y del EDTA para los metales. Como el EGTA forma complejos más estables con Ca²⁺ que con Mg²⁺ y algo menos estables que con Mn²⁺ no se observa ninguna inhibición en presencia de Ca²⁺ cuando existe Mg²⁺ en el medio y sí se observa aunque no tan exagerada, la inhibición del EGTA sobre la enzima en presencia de Mn²⁺. Por otra parte como el EDTA compleja mejor el Mn²⁺ que el Ca²⁺ y éste sólo ligeramente mejor que el Mg²⁺, se observa inhi-

bición absoluta en presencia de Mn^{2+} y sólo una ligera inhibición en presencia de Mg^{2+} .

3.4.1.5. EFECTO DEL GTP

Dada la importancia que este nucleótido posee dentro del esquema de regulación de la adenilato ciclasa, se dispusieron una serie de ensayos conducentes a demostrar el efecto ejercido por el GTP sobre el sistema del adulto farato.

La tabla 19 y la fig. 33 recogen los resultados de estos experimentos.

TABLA 19: Efecto del GTP ($10^{-4}M$) sobre la actividad de la adenilato ciclasa del adulto farato. El resultado se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

ADICION	-GTP	+GTP (0.1 mM)
MgCl ₂ 10 mM	38	33
MnCl ₂ 1 mM	69	35
MgCl ₂ 10 mM + NaF 10 mM	186	151
MnCl ₂ 1 mM + NaF 10 mM	131	97
MgCl ₂ 10 mM + MnCl ₂ 1 mM + NaF 10 mM	318	267
MnCl ₂ 1 mM + NaF 10 mM + NaN ₃ 1 mM	229	151
NaF 10 mM + MgCl ₂ 10 mM + MnCl ₂ 1 mM + NaN ₃ 1 mM	439	293
NaF 10 mM + MnCl ₂ 1 mM + Adn. 1 mM	32	25
NaF 10 mM + MnCl ₂ 1 mM + MgCl ₂ 10 mM + Adn. 1 mM	87	54

De estos experimentos se deduce que en todos los casos el GTP ejerce un efecto inhibitor sobre la actividad enzimática. Esto que "a priori" podría parecer extraño, no lo es si se tiene en cuenta que el adulto farato posee una proporción muy alta de

tejido adiposo, y es precisamente en este tipo de tejido donde se ha observado un comportamiento inhibidor del GTP. Londos y col (193) observan ya esta inhibición en adipocitos de rata a una concentración de GTP inferior a 10^{-6} . Lo cierto es que en los adipocitos se puede observar tanto un efecto inhibidor como un efecto estimulador por parte del GTP (469, 470), los cuales parecen expresarse a través de diferentes procesos (15). Es importante a este respecto señalar que el efecto inhibidor se ve incrementado por la presencia de EGTA y DTT (396). Si se tiene en cuenta que las preparaciones particuladas del adulto farato se realizan en presencia de EDTA y 2-mercaptoetanol y en la incubación de la enzima se mantiene una concentración 10 mM de este último, es razonable pensar que en nuestro sistema el GTP puede ejercer el efecto inhibidor antes apuntado a través de los mismos mecanismos que lo hace en los adipocitos de rata.

3.4.1.6. EFFECTO DE LA ADENOSINA

Para comprobar la actuación de la adenosina sobre la adenilato ciclasa del insecto se ensayó el efecto de ésta a varias concentraciones en presencia de distintos cofactores. Los resultados se recogen en las figs. 34 y 35. El primer hecho que llama la atención es la fuerte inhibición ejercida por la adenosina. Esta inhibición no es equivalente en todos los casos como puede verse en la tabla 20.

Se deduce de estos datos que la inhibición aumenta a medida que la enzima se encuentra en un estado de activación superior. Al mismo tiempo se observa que la inhibición es superior cuando la enzima se ensaya en presencia de Mn^{2+} . Este fenómeno se ha detectado también en otros sistemas biológicos como ya se comentó en la introducción, además en tejido adiposo de Bombyx mori, Morishima (396) ha demostrado recientemente un comporta-

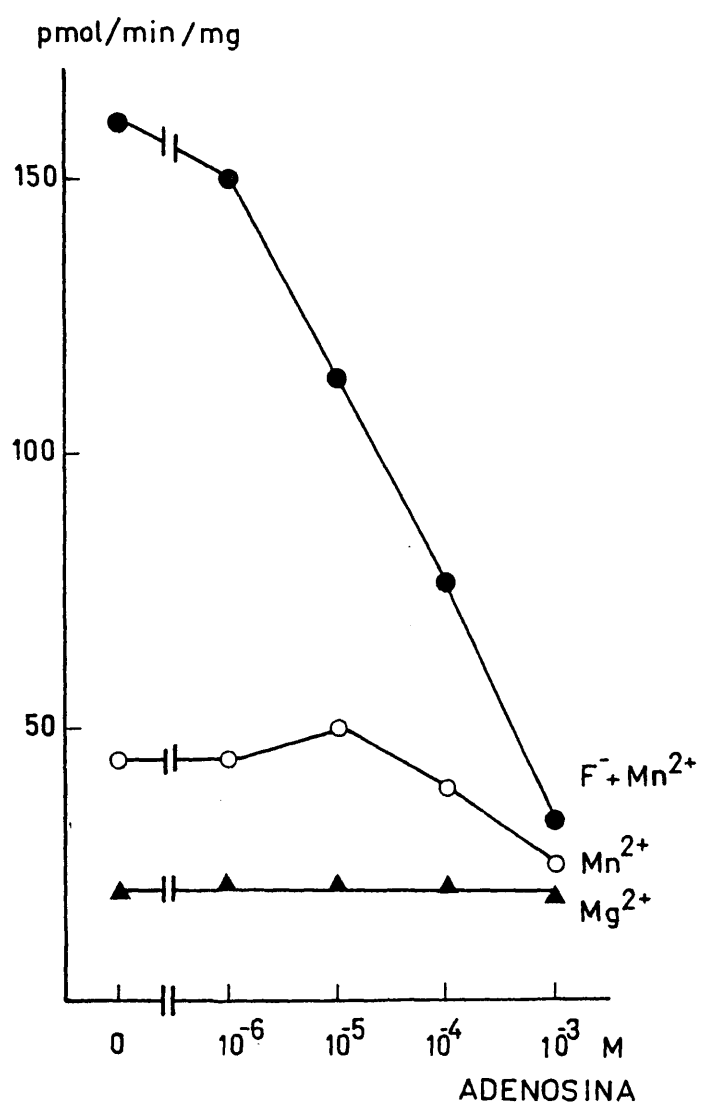


FIGURA 34. Efecto de la adenosina sobre la actividad de adenilato ciclase en presencia de distintos cofactores. La actividad se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

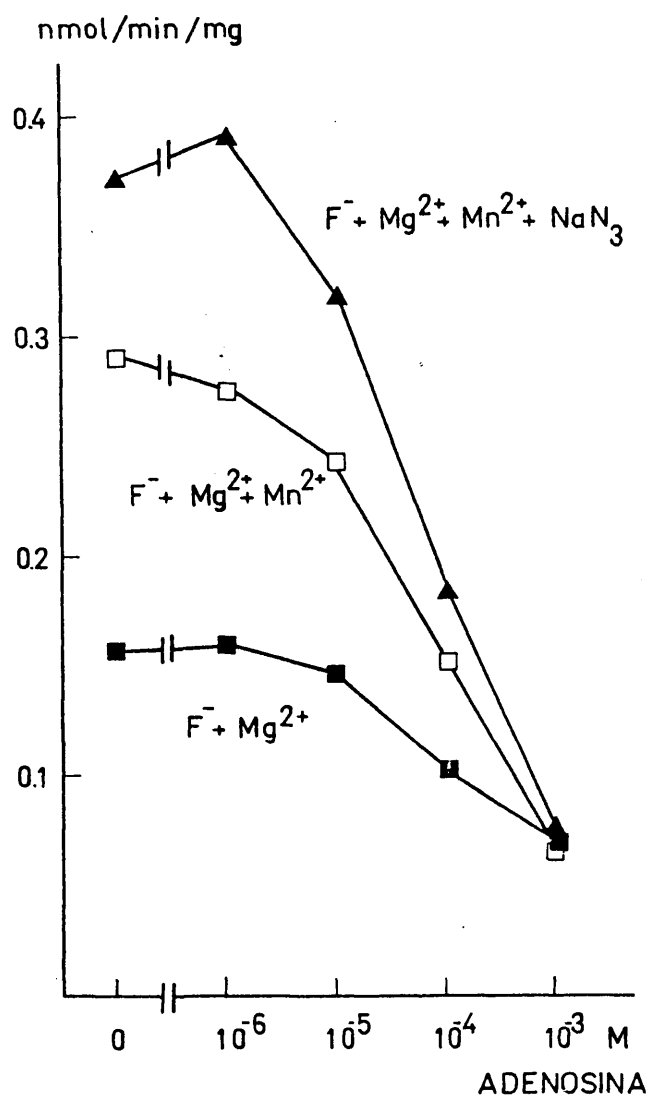


FIGURA 35. Efecto de la adenosina sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de distintos cofactores. La actividad se expresa en nmol cAMP/min/mg proteína.

miento similar. La interpretación de este fenómeno es oscura, ya que todavía no se conoce cual es el mecanismo de inhibición via sitio "P". Resulta evidente que en este caso la inhibición se realiza por esta via, ya que se necesitan concentraciones de adenosinas superiores a 10 μ M, en la mayoría de los estados de activación estudiados, para que la inhibición sea significativa con respecto al control. A concentraciones inferiores a 1 μ M no se observa efecto alguno por lo que se puede pensar que en este caso el denominado sitio "R" o no existe o se necesita algún requerimiento especial para hacer visible algún efecto, como ha sido sugerido por Londos y col (193).

TABLA 20: Inhibición por adenosina 1 mM sobre la adenilato ciclase, expresada en porcentajes de los controles sin adenosina.

	<u>INHIBICION %</u>
MgCl ₂ 10 mM	2
MnCl ₂ 1 mM	43
MgCl ₂ 10 mM + NaF 10 mM	58
MnCl ₂ 1 mM + NaF 10 mM	79
MnCl ₂ 1 mM + MgCl ₂ 10 mM + NaF 10 mM	76
MnCl ₂ 1 mM + MgCl ₂ 10 mM + NaF 10 mM + NaN ₃ 1 mM	80

3.4.1.7. EFECTO DE LA AZIDA SODICA

La azida sódica es un potente activador de la guanilato ciclase en numerosos sistemas como ya se comentó en su momento y existen algunos datos que sugieren la posibilidad de que se comporte también como un activador de la adenilato ciclase en determinadas circunstancias (457). Los resultados en el sistema del

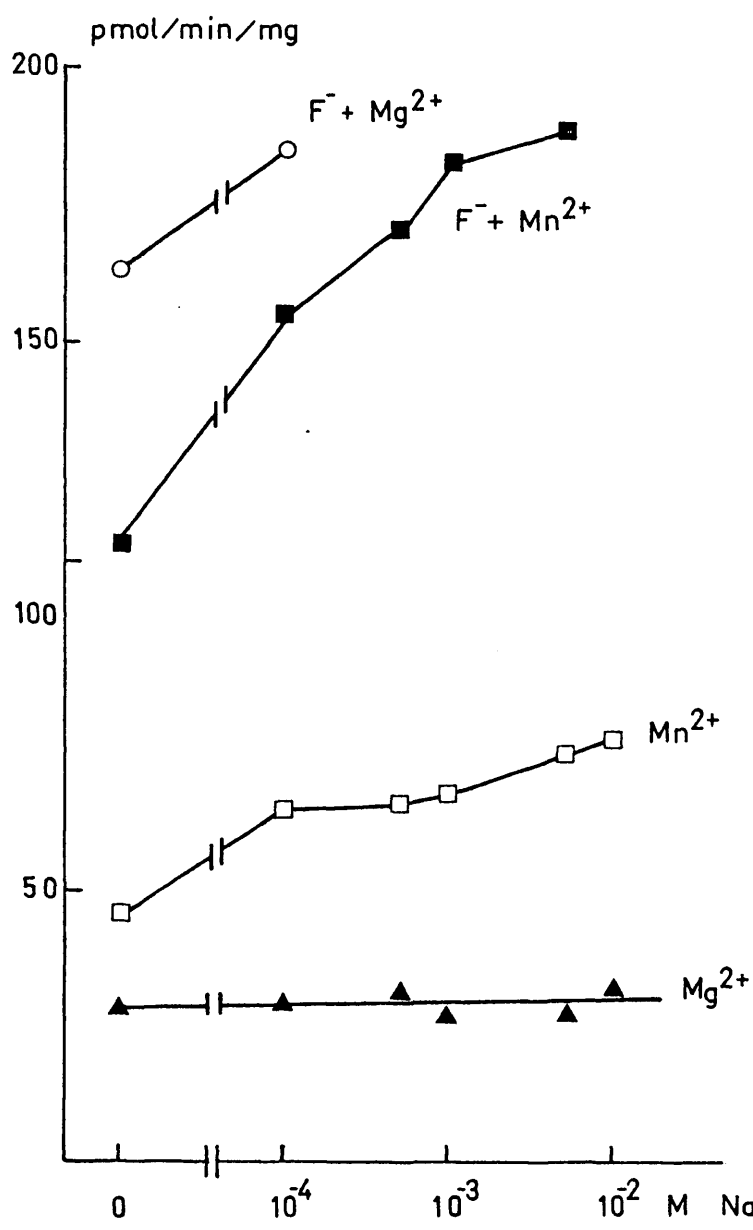


FIGURA 36. Efecto del NaN_3 sobre la actividad de la adenilato ciclasa en presencia de distintos cofactores. La actividad se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

insecto son sorprendentes en el sentido de que la azida no sólo produce un aumento significativo de la actividad, sino que este aumento no se produce en todos los casos por igual. Como se observa en la fig. 36, resulta significativo el hecho de que la activación se produce preferentemente en presencia de Mn^{2+} y de F^- siendo prácticamente nula cuando la enzima se ensaya sólo con Mg^{2+} , como único cofactor.

Estos resultados pueden interpretarse desde el punto de vista de los trabajos de Murad y col (60) los cuales han demostrado que la guanilato ciclasa en presencia de NaN_3 y Mn^{2+} es capaz de sintetizar cAMP a partir de ATP. En este caso se podría pensar que el incremento de actividad sería debido a la colaboración en la biosíntesis de cAMP de una guanilato ciclasa endógena. Sin embargo, queda la duda de por qué el incremento se hace mayor en presencia de F^- que en ausencia del mismo, cuando éste en realidad no debería afectar a la guanilato ciclasa.

3.4.1.8. EFECTO DE LA FUERZA IONICA

Con vistas a establecer si era necesaria en el medio de incubación una determinada fuerza iónica para optimizar la actividad de la adenilato ciclasa, se llevó a cabo una serie de ensayos en los cuales se comparó el efecto ejercido por el NaCl sobre la actividad de la enzima en presencia de distintos cofactores, los resultados se observan en la fig. 37. Se puede apreciar que en presencia de Mn^{2+} 1 mM la enzima apenas sufre inhibición incluso a altas concentraciones de NaCl. En tanto que con Mg^{2+} 10 mM y F^- 10 mM la enzima se inhibe a concentraciones del orden de 0.1 M. Cuando se activa la enzima con Mg^{2+} 10 mM, Mn^{2+} 1 mM y F^- 10 mM, la inhibición con NaCl 0.1 M es prácticamente nula aunque a medida que se aumenta la fuerza iónica se produce una pérdida de actividad considerable. Parece por lo tan

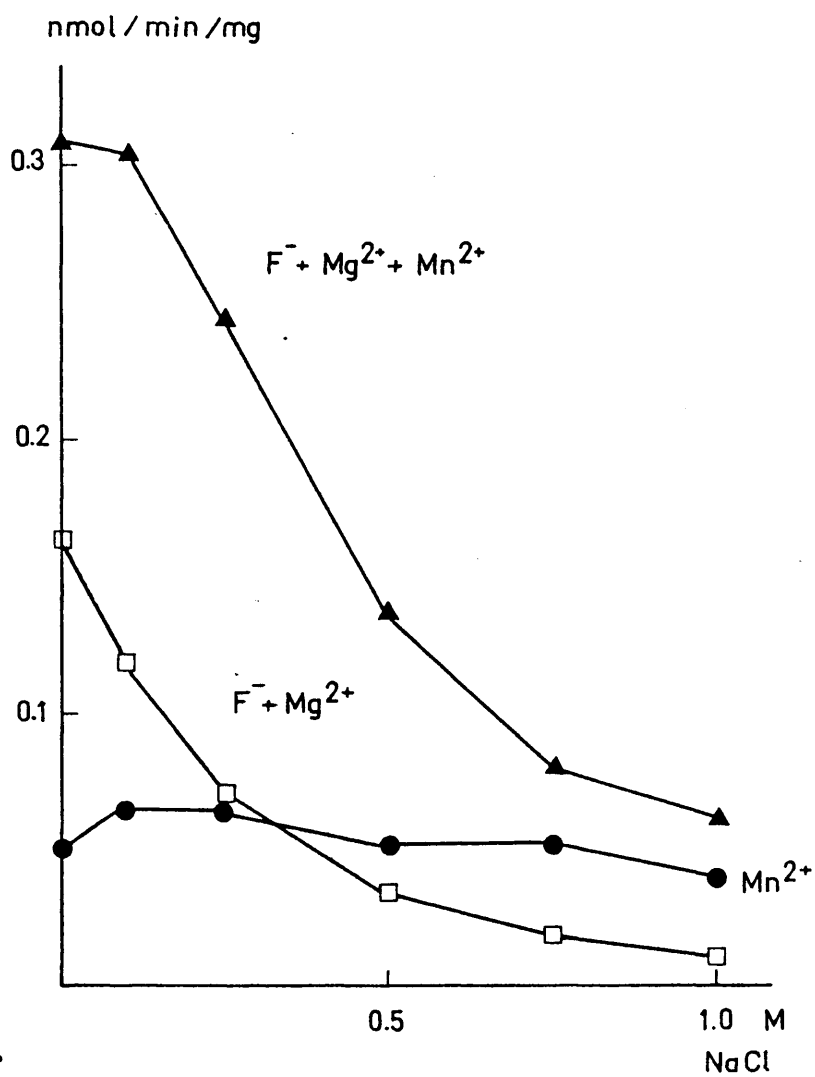


FIGURA 37. Influencia de la fuerza iónica sobre la actividad de la adenilato ciclasa. La actividad se expresa en nmol cAMP/min/mg proteína.

to evidente que la presencia de Mn^{2+} en el medio provoca un cambio conformacional en la enzima que le hace menos sensible a las variaciones de fuerza iónica. Esto podría tener una importancia crucial, ya que podría constituir una forma de regulación de la enzima, más aún, si tenemos en cuenta que en las inmediaciones de la membrana se pueden producir variaciones locales en la concentración de electrolitos como consecuencia de los procesos de permeabilidad y de transporte, que en muchas ocasiones son provocados por un aumento de los niveles de cAMP. Se podría ejercer de esta manera un control por retroalimentación tanto en sentido positivo como en sentido negativo en dependencia del estado de activación en el que se encuentre la enzima.

3.4.2. CABEZA DEL INSECTO ADULTO

3.4.2.1. DISTRIBUCION EN SUBFRACCIONES

Con objeto de mejorar la calidad del preparado enzimático de adenilato ciclasa buscando sobre todo una fracción particulada que pudiese responder a hormonas o neurotransmisores se pensó que sería necesario diseccionar alguno de los órganos internos del insecto o alguna región rica en tejido nervioso.

A tal objeto se separaron las cabezas del insecto adulto y el homogeneizado se sometió a una serie de centrifugaciones diferenciales seguidas de una centrifugación en gradiente de sacarosa. Los resultados de tales procesos se reúnen en la fig. 38. En este histograma se puede apreciar el gran aumento de actividad específica que se produce al fraccionar la muestra. A la vista de estos datos se eligió como fracción preferencial la interfase de 1.0 M de sacarosa, ya que si bien, la interfase de 0.75 M posee mayor actividad específica también presenta una menor masa de proteína, lo que le hace poco apropiada para los ensayos.

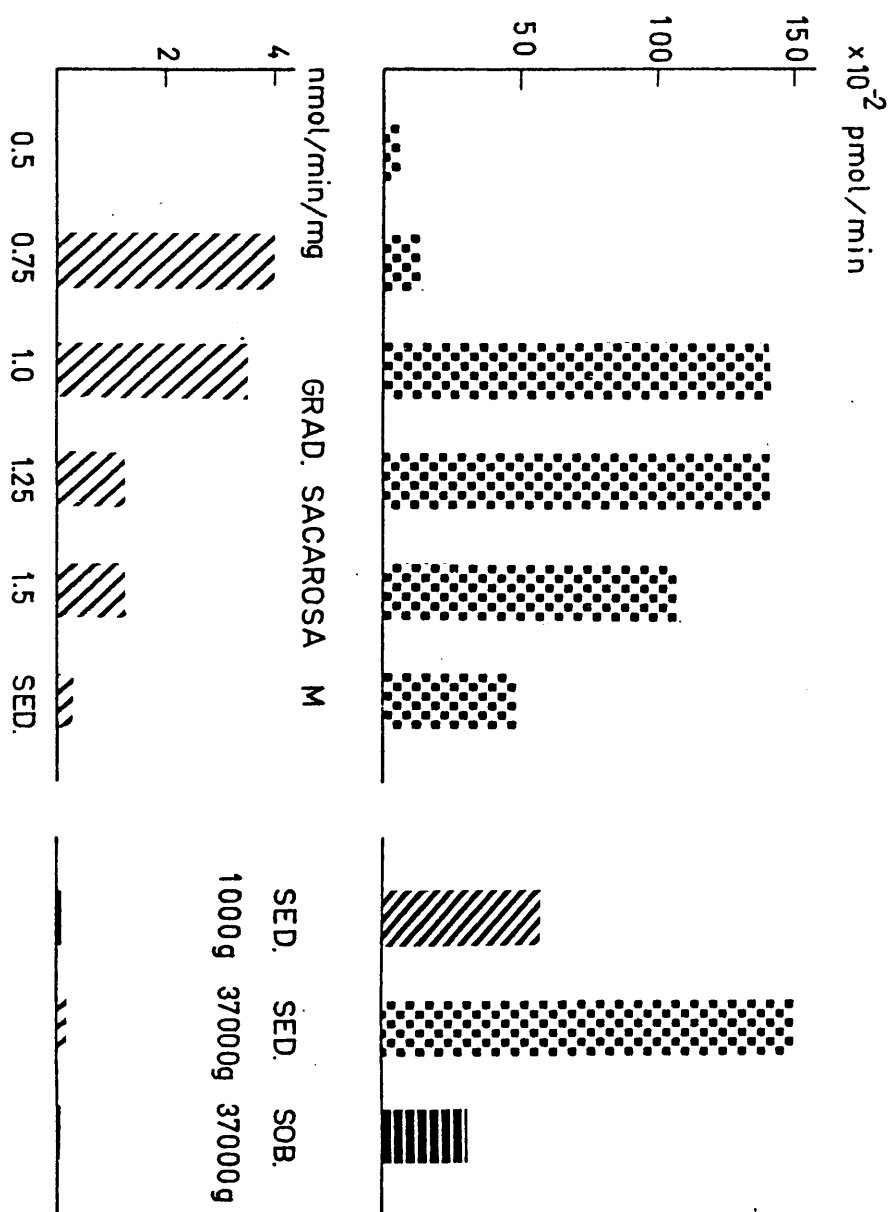


FIGURA 38. Distribución de la adenilato ciclasa en las subfracciones del homogenizado.

En las fracciones del gradiente de sacarosa más interesantes desde el punto de vista de la actividad específica se determinó la composición porcentual de fosfolípidos y de colesterol con objeto de comprobar la existencia de alguna diferencia significativa entre las mismas. Los resultados pueden verse en las tablas 21 y 22.

TABLA 21: Fosfolípidos presentes en las distintas fracciones particuladas obtenidas en las interfases de un gradiente discontinuo de sacarosa.

FOSFOLIPIDO, %	SEDIMENTO	INTERFASE	INTERFASE	INTERFASE
		1.5 M	1.25 M	1.0 M
PC	26	25	27	25
PE	49	50	51	52
LPE	6	7	6	6
PI	2	4	2	1
PS + LPC	17	14	14	16

TABLA 22: Colesterol en las fracciones particuladas obtenidas en dos experimentos diferentes utilizando un gradiente discontinuo de sacarosa (M).

	EXPERIMENTO 1		EXPERIMENTO 2		
	INTERFASES UNIDAS		INTERFASE	INTERFASE	INTERFASE
	1.0 + 1.25 + 1.5		1.0	1.25	1.5
COLESTEROL (μ g/mg LT)	50		50	56	56

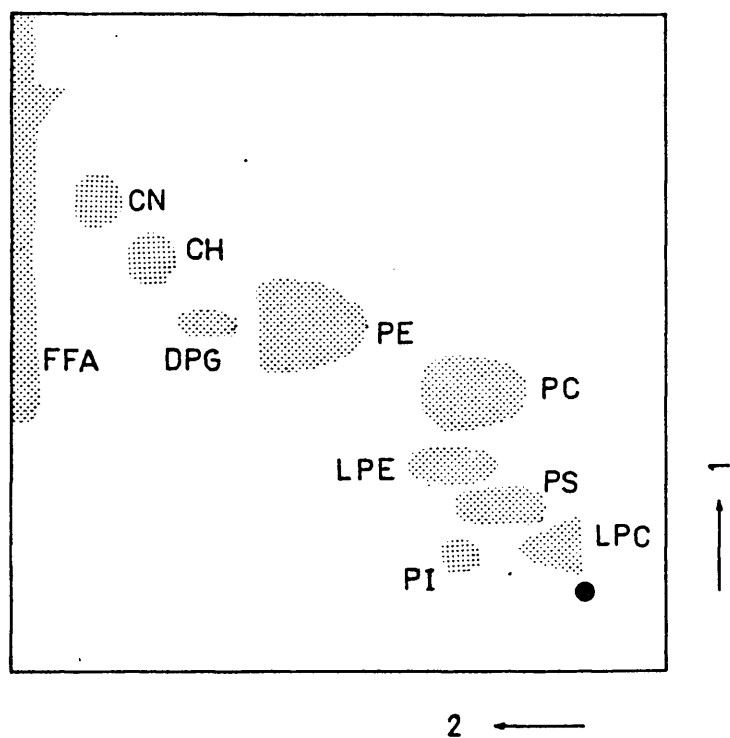


FIGURA 39. Cromatografía en capa fina de los fosfolípidos presentes en las preparaciones de membrana de cabezas de adulto.

La fracción de 0.75 M no se pudo valorar debido a la pequeñísima masa que se obtuvo y por esta razón no figura en la tabla.

Como no se observó diferencia significativa alguna en la composición de fosfolípidos y en la cantidad de colesterol no se pudo deducir conclusión alguna acerca de estos datos. Sin embargo, fue mucho más significativo el hecho de que al cromatografiar en dos dimensiones (1º. cloroformo/ metanol/ amoniaco/ agua (130:50:5:3:3.5), 2º. cloroformo/acetona/metanol/acético/ agua (6:8:2:2:1)), los fosfolípidos totales de las interfases unidas del experimento 1 de la tabla 22, se pudo obtener como se muestra en la fig. 25, un patrón de desarrollo donde aparecen dos manchas que se revelan con un reactivo especial para azúcares (α -Naftol 0.5% en metanol/agua (1:1), pulverizado con SO_4H_2 95%) y que por su posición y características se pueden considerar como cerebrósidos con ácidos grasos normales (CN) y ácidos grasos hidroxilados (CH).

3.4.2.2. EFFECTO DE LOS CATIONES DIVALENTES

Igual que sucede con la adenilato ciclase del adulto farato, la adenilato ciclase de la cabeza presenta un requerimiento absoluto de un metal divalente como Mn^{2+} o Mg^{2+} para llevar a cabo la reacción de hidrólisis del ATP. Los requerimientos para ambos cationes pueden verse en la fig. 40.

Las concentraciones óptimas de ambos cationes son de 1 mM para el Mn^{2+} y de 10 mM para el Mg^{2+} .

La diferencia más significativa con la enzima de adulto farato es que en la cabeza la relación de actividades óptimas en presencia de Mn^{2+} y Mg^{2+} varía de 2.5 a 3.5, relación que es superior a la anteriormente apuntada -1.5 a 2.5- para el adulto farato. Por lo tanto, todo lo que anteriormente se ha discutido

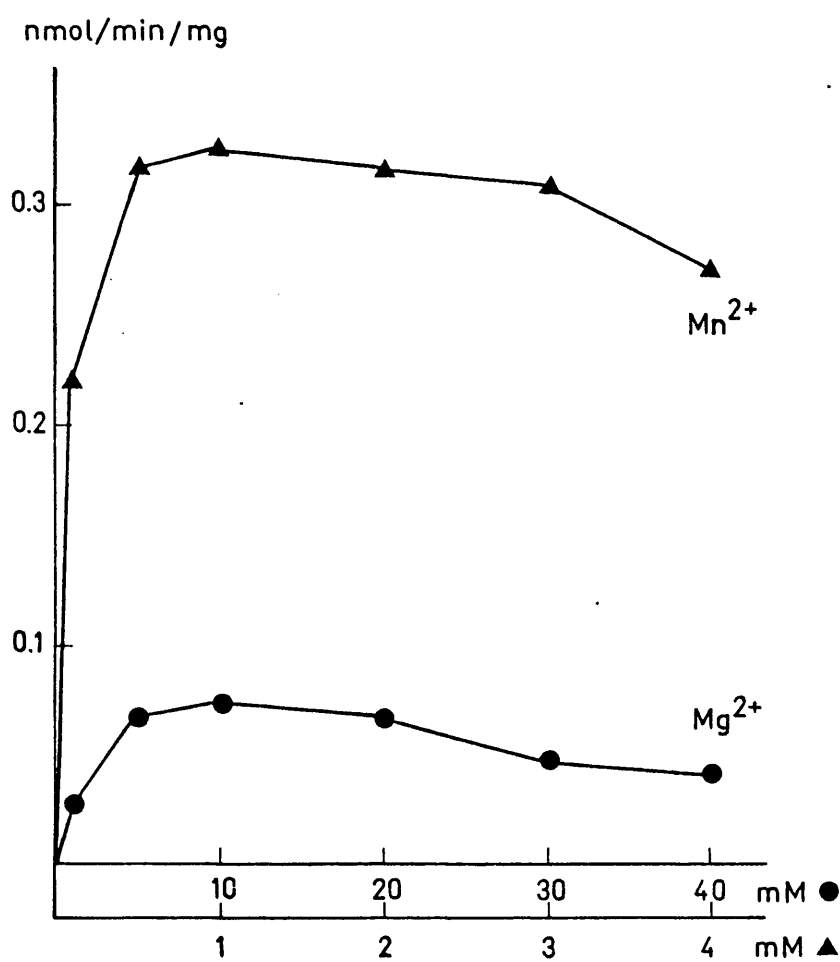


FIGURA 40. Influencia del $MgCl_2$ y $MnCl_2$ sobre la actividad de la adenilato ciclasa. La actividad se expresa en nmol cAMP/min/mg proteína.

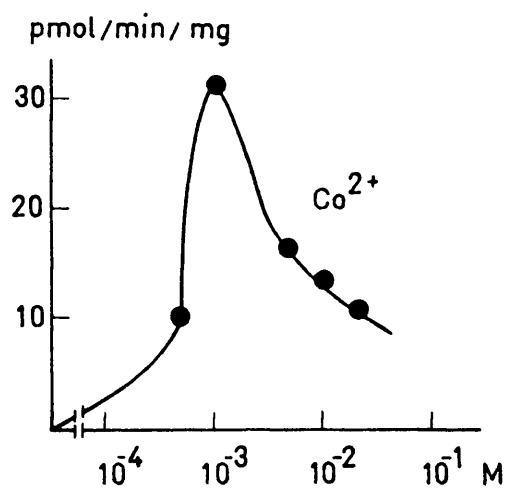


FIGURA 41. Actividad de adenilato ciclasa en presencia de CoCl_2

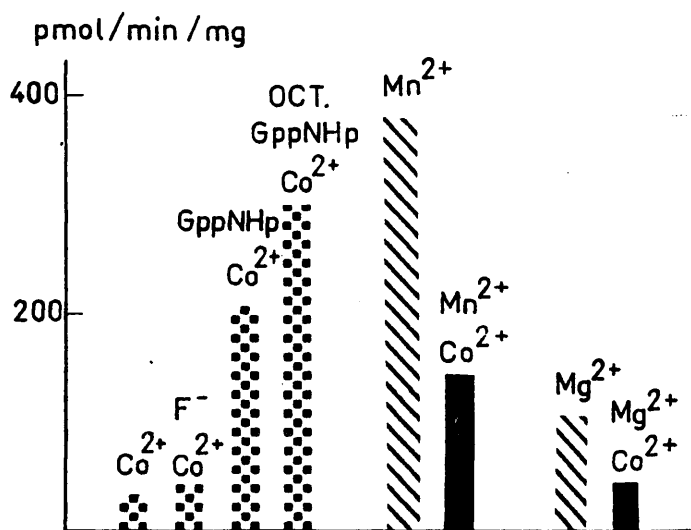


FIGURA 42. Efecto de diferentes moduladores sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de CoCl_2 1 mM. La actividad se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

sobre la presencia de un segundo sitio que une el metal, se ve en este caso ratificado y ampliado, ya que de no existir ese sitio es muy difícil dar una interpretación coherente a las diferencias de comportamiento observadas entre el Mg^{2+} y el Mn^{2+} .

También se ha estudiado si la enzima podía catalizar la biosíntesis de cAMP en presencia de otros metales divalentes como Co^{2+} , Ca^{2+} o Zn^{2+} . Tanto el Ca^{2+} como el Zn^{2+} son absolutamente ineficaces a tal fin, en tanto que el Co^{2+} puede dar cuenta de unos niveles de actividad que si bien son inferiores a los observados con Mn^{2+} y Mg^{2+} , son lo suficientemente importantes como para ser considerados como significativos. Esto se observa en la fig. 41. El máximo de actividad se encuentra a una concentración próxima a 1 mM de $CoCl_2$.

La diferencia de comportamiento entre el Co^{2+} , Mg^{2+} y Mn^{2+} es que mientras el Mg^{2+} no se comporta como un inhibidor de la actividad cuando se encuentra presente el Mn^{2+} como activador, el Co^{2+} , sin embargo, es ligeramente inhibidor de las actividades basales determinadas con Mg^{2+} o Mn^{2+} . Esto último puede verse en la fig. 42. El Co^{2+} mantiene por lo tanto un comportamiento intermedio entre Ca^{2+} y Zn^{2+} , y Mg^{2+} y Mn^{2+} , ya que puede dar cuenta de parte de la actividad de la enzima igual que el Mg^{2+} y el Mn^{2+} pero se comporta como un inhibidor en presencia de estos últimos, igual que lo hacen el Ca^{2+} y Zn^{2+} , los cuales son incapaces de proporcionar actividad alguna.

Se ha estudiado también el comportamiento cinético frente a la concentración de ATP, manteniendo fija la concentración de Mg^{2+} a 10 mM y la de Mn^{2+} a 1 mM. Los resultados pueden verse en la fig. 43.

Los valores de K_m y V_{max} aparentes para el Mg^{2+} son de 120 μM y 900 pmol/min/mg en tanto que para el Mn^{2+} son de 30 μM y 900 pmol/min/mg. De estos datos se deduce que en presencia de

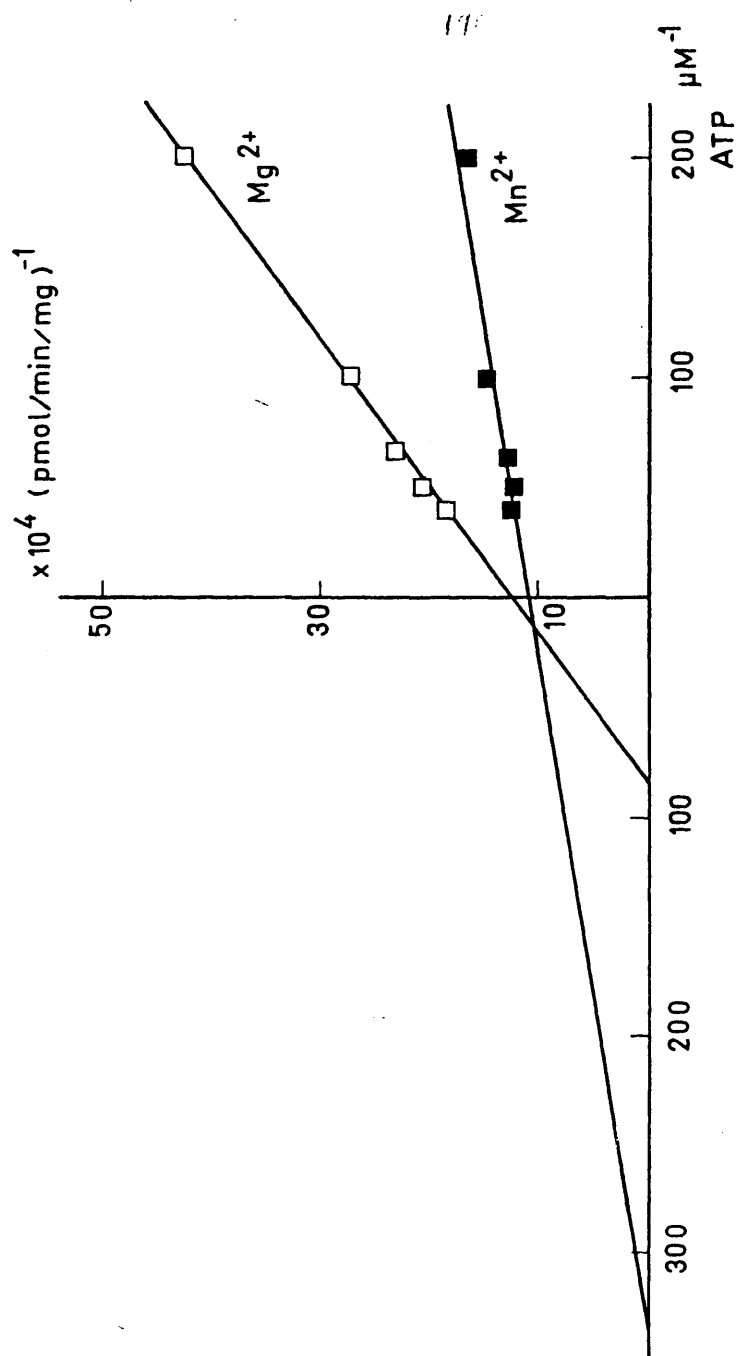


FIGURA 43. Representación de Lineweaver-Burk para la actividad de adenilato ciclasa frente a ATP en presencia de MgCl_2 10 mM o MnCl_2 1 mM. La actividad se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

Mn^{2+} el sustrato posee mayor afinidad por la enzima que en presencia de Mg^{2+} y al mismo tiempo la V_{max} es ligeramente superior, lo que podría indicar que el efecto activador del Mn^{2+} se podría deber, bien a que el complejo Mn^{2+} -ATP posee más afinidad por la enzima que el Mg^{2+} -ATP, o bien que se produce a través de un sitio alostérico un cierto cambio en la estructura de la enzima que aumenta la afinidad por el sustrato. Este último aspecto debe prevalecer sobre el primero, ya que si fuera debido a que el Mn^{2+} -ATP es mejor sustrato, el Mg^{2+} se debería comportar como un inhibidor en presencia de Mn^{2+} , lo cual no se ha comprobado nunca incluso a concentraciones altas de Mg^{2+} . De hecho el Mg^{2+} y el Mn^{2+} juntos pueden proporcionar una actividad superior a la que se obtiene con cada uno de ellos independientemente. En cualquier caso cuando pueden influir muchos factores en las cinéticas de sustrato, es francamente difícil llegar a soluciones convincentes acerca de los mecanismos de actuación de los distintos cofactores.

3.4.2.3. EFECTO DEL FLUORURO Y OTROS IONES

La acción del fluoruro sobre la adenilato ciclasa de la cabeza se ha estudiado en presencia de Mn^{2+} , Mg^{2+} y Co^{2+} . En la fig. 42 puede verse el efecto activador del F^{-} (10 mM) sobre la actividad basal medida con Co^{2+} (1 mM). En la fig. 44 se establece la concentración óptima de activación por F^{-} sobre la actividad basal con Mn^{2+} (1 mM) y Mg^{2+} (10 mM). La concentración óptima es del orden de 10 mM. Lo más significativo de esta respuesta es que la activación es superior no sólo en porcentaje sino en valor absoluto cuando la enzima se valora con Mg^{2+} que si se hace con Mn^{2+} . El resultado es equivalente al que se obtuvo con el adulto farato, pero en cierta medida amplificado, ya que se parte de unos valores basales más desproporcionados para ambos cationes.

Las cinéticas de sustrato en presencia de los pares Mg^{2+} 10 mM/ F^{-} 10 mM y Mn^{2+} 1 mM/ F^{-} 10 mM, pueden verse en la fig. 45.

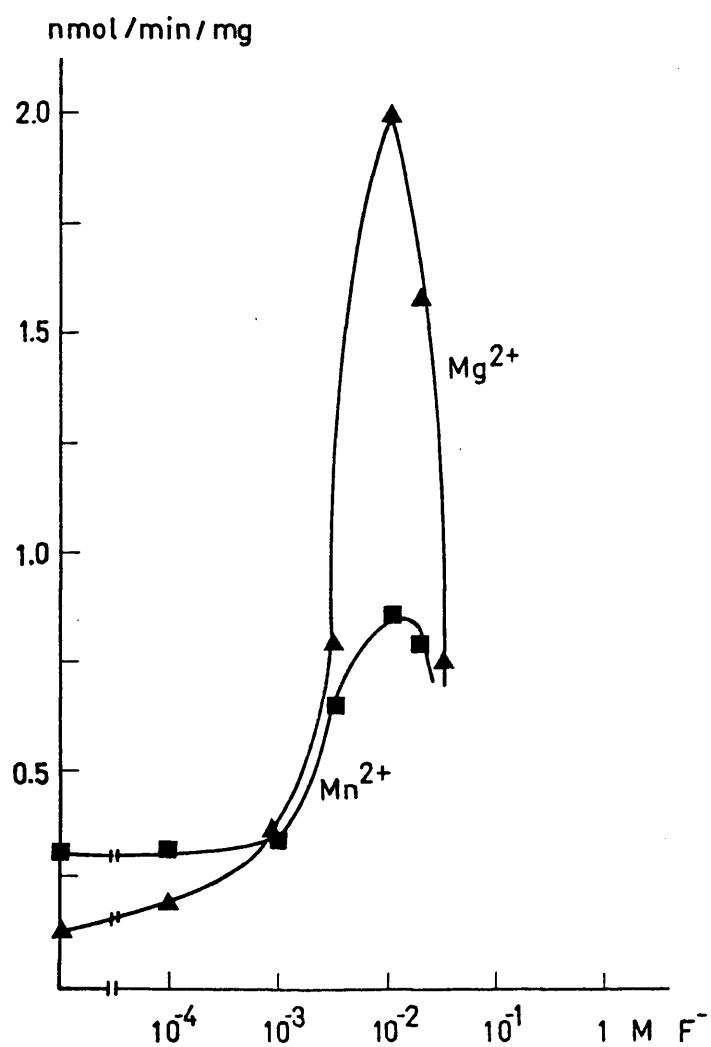


FIGURA 44. Influencia del NaF en la actividad de adenilato ciclasa en presencia de $MgCl_2$ 10 mM o $MnCl_2$ 1 mM. La actividad se expresa en nmol cAMP/min/mg proteína.

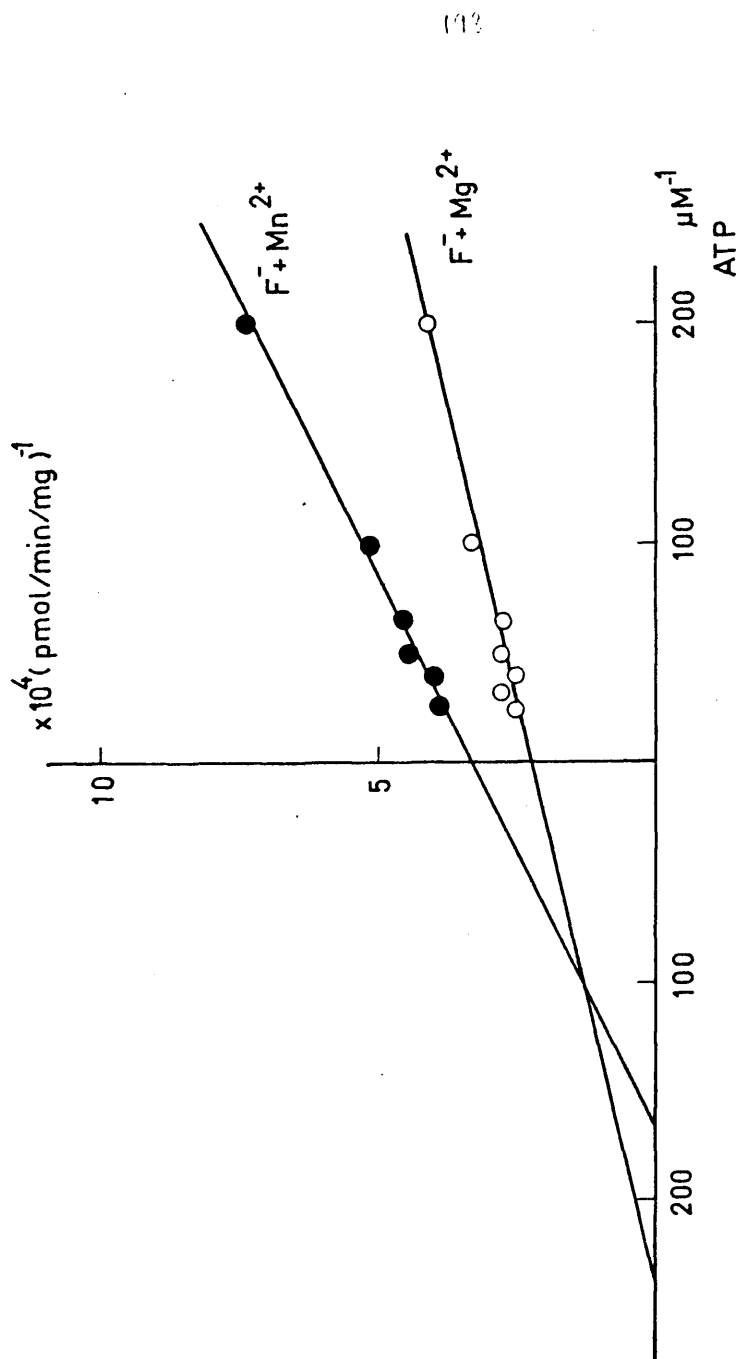


FIGURA 45. Representación de Lineweaver-Burk para la actividad de adenilato ciclasa frente a ATP en presencia de NaF 10 mM y MgCl_2 10 mM o MnCl_2 1 mM. La actividad se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

Los valores respectivos de K_m aparente son de $43 \mu M$ y $60 \mu M$, en tanto que los de V_{max} son de 4450 pmol/min/mg y 3000 pmol/min/mg . Comparando estos datos con las actividades basales se observa un cambio de valores en todos los sentidos, ya que en este caso las K_m son ahora más semejantes que los valores de V_{max} y al mismo tiempo se produce una inversión en sus valores relativos, no sólo con respecto a la actividad basal sino entre ellos mismos. Realmente lo que parece ocurrir es que la combinación de los efectos del F^- y los cationes metálicos provoca una serie de cambios conformacionales diferentes según las distintas combinaciones posibles, de tal forma que cada uno de los estados conformacionales posee unas características cinéticas distintas en función de la mayor o menor disponibilidad del sustrato y de la capacidad de hidrólisis del centro activo.

Aparte de los estudios realizados con el NaF se han estudiado los efectos de otras sustancias como Na_2WO_4 , Na_2MoO_4 y NH_4VO_3 . Los resultados pueden verse en las tablas 23 y 24.

TABLA 23: Efecto de diferentes aniones ensayados a varias concentraciones (M) sobre la actividad basal de adenilato ciclasa de cabezas de adulto determinada en presencia de $MgCl_2$ 10 mM. Los resultados se expresan en $\text{pmol cAMP/min/mg de proteína}$.

ADICION	0	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	2×10^{-2}	4×10^{-2}
Nada	124	-	-	-	-	-	-	-
NaF	-	-	-	169	370	1.993	1.641	739
Na_2WO_4	-	122	228	647	1363	1579	-	-
NH_4VO_3	-	181	270	715	1279	-	-	-
Na_2MoO_4	-	-	147	346	609	854	-	-

TABLA 24: Efecto de distintos aniones ensayados a concentraciones fijas sobre la actividad basal de la adenilato ciclasa de cabeza de adulto determinada en presencia de distintos cationes. El resultado se expresa como porcentaje referido a la actividad basal medida en presencia de MgCl_2 10 mM ($\bar{x} - \sigma_{n-1}(n)$), donde \bar{x} representa el valor medio, σ_{n-1} la desviación estandar y n el número de experimentos realizados, ensayados a su vez por duplicado.

ADICION	10 mM MgCl_2 +		
	10 mM MgCl_2	1 mM MnCl_2	1 mM MnCl_2
Nada	100	286 ± 38 (7)	330 ± 25 (2)
NaF 10 mM	1 536 ± 160 (8)	591 ± 165 (5)	2 468 ± 208 (2)
Na_2WO_4 10 mM	1 262 ± 82 (4)	534 ± 28 (2)	748 ± 40 (2)
NH_4VO_3 1 mM	1 104 ± 148 (3)	295 ± 52 (2)	455 ± 29 (2)
Na_2MoO_4 1 mM	549 ± 75 (3)	979 ± 108 (3)	1 502 ± 93 (2)

De toda esta colección de datos son varias las conclusiones que se pueden obtener. En primer lugar, se observa un efecto activador por parte de las distintas sustancias que ha de ser achacado a la presencia de sus respectivos aniones en disolución. Hay que hacer constar que aunque en la tabla se han puesto los datos obtenidos con NH_4VO_3 , se obtuvieron, en todos los casos, idénticos resultados con NaVO_3 comprobándose además que el NH_4^+ no ejerce efecto alguno sobre la enzima. Realmente aunque los aniones que se originarían directamente de las sales son F^- , $\text{WO}_4^{=}$, VO_3^- y $\text{MoO}_4^{=}$ no ha sido posible determinar si son estas u otras formas complejas, oxidadas o reducidas de los mimos, las responsables de la activación, ya que el comportamiento de estos aniones en disolución es complejo y no existen en la bibliografía datos claros al respecto.

Resulta muy interesante que tanto el vanadato, como el

molibdato se comporten como activadores de la enzima de insectos, ya que hasta el momento son muy pocos los trabajos en los que se ha hecho referencia a esta capacidad activadora (130-132). A la vista de esto se puede pensar, dada la diferencia entre los mamíferos y los insectos, que el comportamiento activador puede ser tan generalizable como el del fluoruro. La verdadera novedad es el wolframato del cual la única referencia que existe hasta el momento es la ausencia de efecto activador en membranas de hígado de rata (132); sin embargo, en nuestro sistema el anión se comporta como un activador prácticamente de la misma potencia que el fluoruro. Hasta que no se disponga de más datos al respecto no se podrá saber a que se debe esta dualidad de actuación. De todas formas, wolframato y molibdato no tienen ni con mucho la importancia que a nivel de regulación podría poseer el vanadato, ya que este anión se encuentra en la célula en concentración suficiente como para ejercer su acción sobre la actividad de la adenilato ciclasa y otras enzimas como ya se puso de manifiesto en la introducción.

Era de interés pues, comparar el comportamiento de estos aniones frente al Mn^{2+} y Mg^{2+} . Lo que más llama la atención es la inversión de porcentajes de activación que se produce con el molibdato, es decir, en tanto que los otros aniones proporcionan mayor activación en presencia de Mg^{2+} , el molibdato lo hace en presencia de Mn^{2+} . Este efecto se estudió con más detalle a distintas concentraciones de molibdato y los resultados se representan en la fig. 46. Comparando esta figura con la fig. 44 se puede apreciar mejor lo que apuntábamos más arriba.

Con el vanadato sucede que en presencia de Mn^{2+} se pierde toda capacidad activadora. Es el caso extremo de lo que ocurre con el fluoruro y el wolframato.

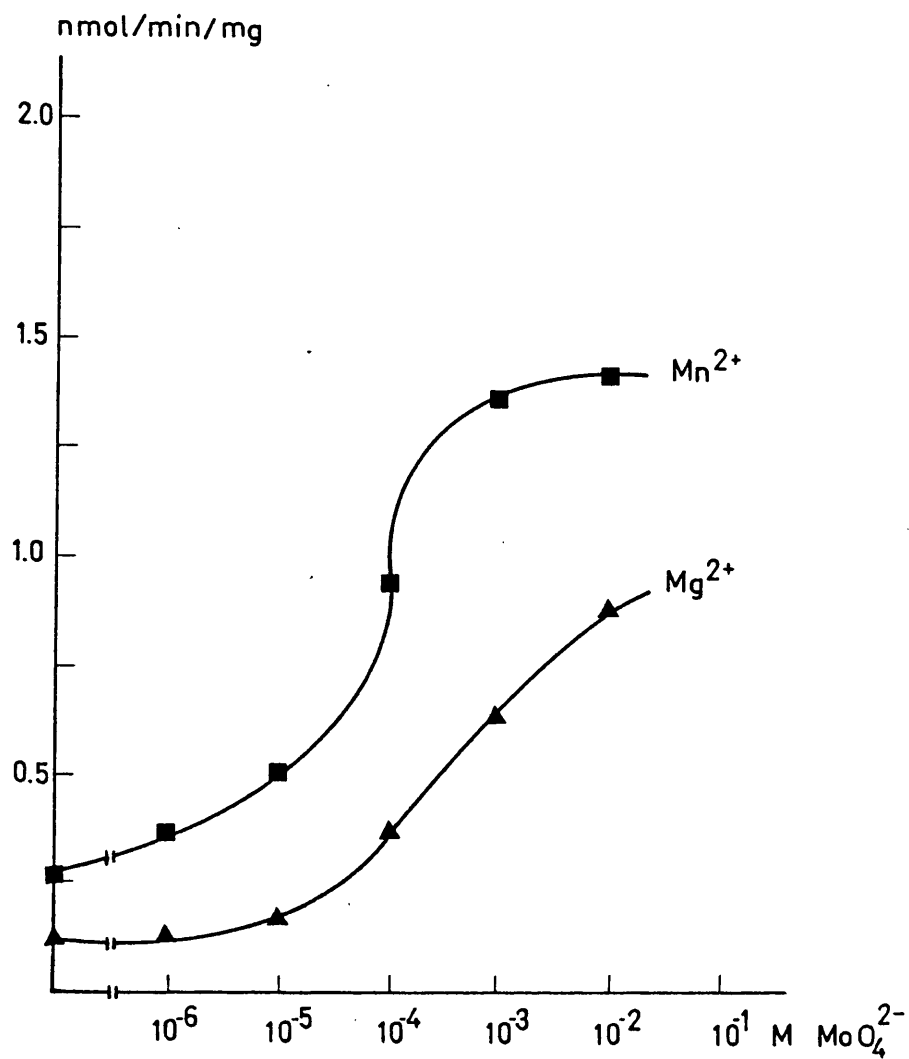


FIGURA 46. Influencia del Na_2MoO_4 sobre la actividad de adenilato ciclase en presencia de MgCl_2 10 mM o MnCl_2 1 mM. La actividad se expresa en nmol cAMP/min/mg proteína.

Por otra parte, en presencia de Mn^{2+} y Mg^{2+} se produce un efecto sinérgico cuando se ensaya el fluoruro y el molibdato, pero se inhibe con respecto al valor obtenido con el vanadato y wolframato en presencia de Mg^{2+} .

En la fig. 47, se examina la aditividad de estos aniones con respecto al fluoruro. No se observó aditividad alguna entre los distintos aniones. Esto podría indicar bien que la enzima ha alcanzado un techo en su actividad o que el efecto se realiza a través del mismo sitio. Esto último es lo más probable, ya que el techo de la enzima no se alcanza con F^- 10 mM y Mg^{2+} 10 mM, puesto que en presencia de Mn^{2+} se puede conseguir una actividad superior. Hasta el momento todos los trabajos que se han hecho con estos aniones parecen indicar que su mecanismo de acción es similar al del fluoruro (130-132).

Hay que resaltar la estrecha relación entre los cationes y los aniones, lo que parece indicar que, o bien la unión del anión a la enzima se realiza a través de algún tipo de complejo con el metal o existe entre el sitio aniónico, catiónico y catalítico cierta posibilidad de interacción que determinaría, en cada caso, qué sitio debe ser ocupado por cada efector, en función de sus afinidades y de sus proporciones estequiométricas en la mezcla.

En la fig. 48, se han dispuesto en orden creciente las actividades de la enzima en presencia de $MgCl_2$ 10 mM, $MnCl_2$ 1 mM Na_2MoO_4 1 mM y NaF 10 mM en todas las combinaciones posibles según el diagrama siguiente:

- 1º. $MgCl_2$ 10 mM
- 2º. $MnCl_2$ 1 mM
- 3º. $MgCl_2$ 10 mM + $MnCl_2$ 1 mM
- 4º. $MnCl_2$ 1 mM + NaF 10 mM

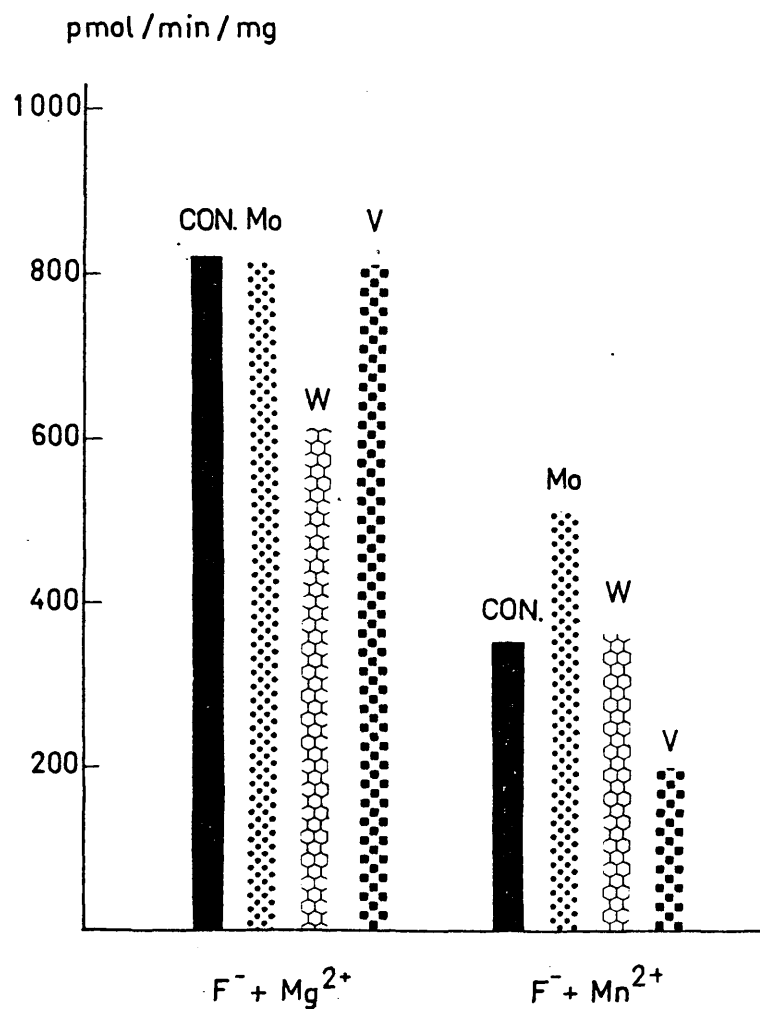


FIGURA 47. Determinación de la aditividad del efecto del Na_2MoO_4 1 mM Na_2WO_4 10 mM y $NaVO_3$ 1 mM con el del NaF 10 mM sobre la actividad de adenilato ciclasa, en presencia de $MgCl_2$ 10 mM o $MnCl_2$ 1 mM.

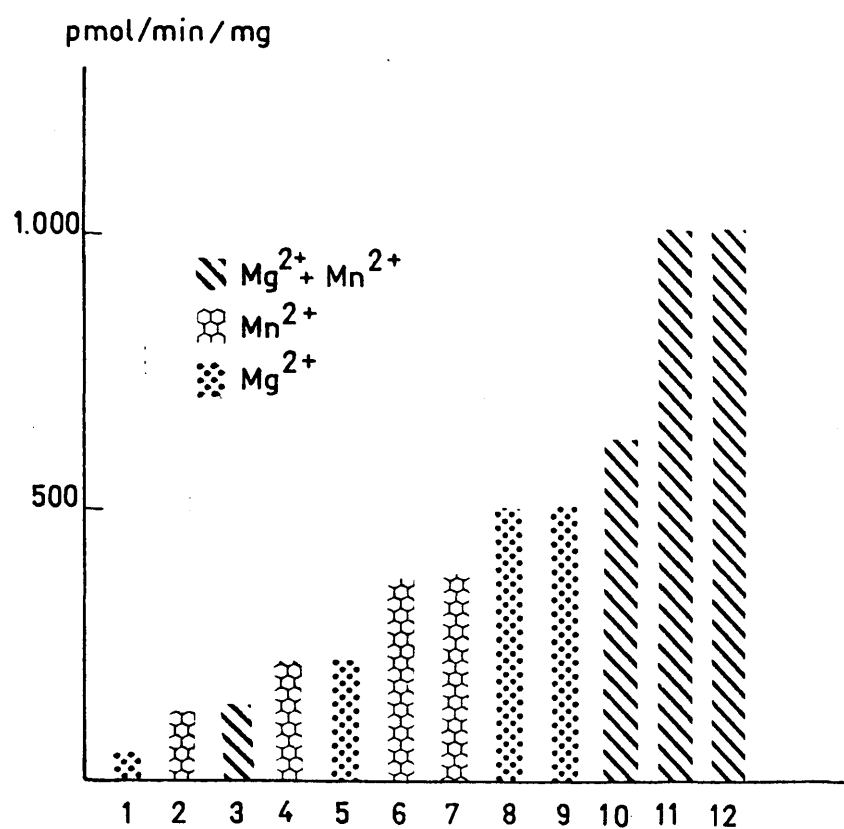


FIGURA 48. Determinación de la actividad de adenilato ciclasa en presencia de diferentes cofactores. La actividad se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

- 5º. MgCl_2 10 mM + Na_2MoO_4 1 mM
- 6º. MnCl_2 1 mM + NaF 10 mM + Na_2MoO_4 1 mM
- 7º. MnCl_2 1 mM + Na_2MoO_4 1 mM
- 8º. MgCl_2 10 mM + NaF 10 mM + Na_2MoO_4 1 mM
- 9º. MgCl_2 10 mM + NaF 10 mM
- 10º. MgCl_2 10 mM + MnCl_2 1 mM + Na_2MoO_4 1 mM
- 11º. MgCl_2 10 mM + MnCl_2 1 mM + NaF 10 mM
- 12º. MgCl_2 10 mM + MnCl_2 1 mM + NaF 10 mM + Na_2MoO_4 1 mM

3.4.2.4. EFECTO DEL CALCIO

El efecto del Ca^{2+} se determinó en este caso frente a las actividades basales de la adenilato ciclasa en presencia de MnCl_2 1 mM y de MgCl_2 10 mM. El resultado puede verse en la fig. 49. Igual que sucede con la adenilato ciclasa del adulto farato, el efecto inhibitor del calcio es superior cuando la enzima se valora en presencia de Mg^{2+} que cuando se hace en presencia de Mn^{2+} .

En la tabla 25, se compara el efecto inhibitor del Ca^{2+} sobre la actividad enzimática en presencia de distintos activadores. Los resultados indican que la inhibición es superior en presencia de Mg^{2+} que de Mn^{2+} , lo que podría indicar que el Mn^{2+} tendría más afinidad que el Ca^{2+} y que el Mg^{2+} por ese posible centro de unión alostérico de metales y por lo tanto la inhibición sería mucho menor que con Mg^{2+} el cual no podría competir satisfactoriamente con el calcio.

El hecho de que en presencia de fluoruro y magnesio la inhibición sea menor que con magnesio, se puede explicar por una razón puramente química, ya que el Ca^{2+} puede formar un complejo con el F^- que disminuiría la concentración efectiva del metal y por lo tanto reduciría su efecto inhibitor. Algunas pruebas más en favor de esto último, se verán más adelante.

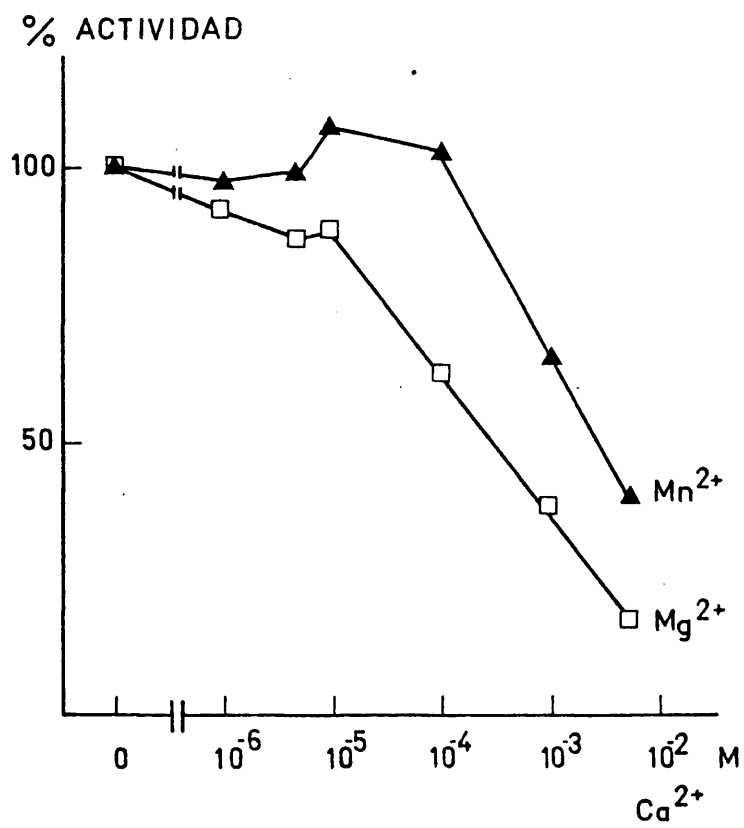


FIGURA 49. Efecto del CaCl_2 sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de MgCl_2 10 mM o MnCl_2 1 mM.

202 66

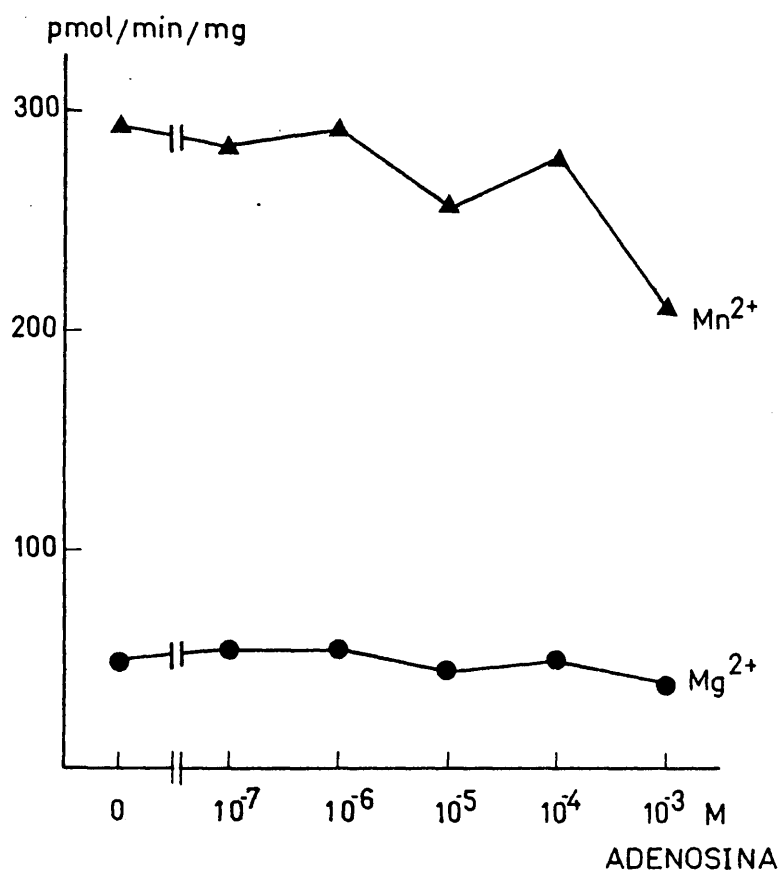


FIGURA 50. Efecto de la adenosina sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de $MgCl_2$ 10 mM o $MnCl_2$ 1 mM. La actividad se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

TABLA 25: Efecto de CaCl_2 1 mM sobre la adenilato ciclasa de cabeza del insecto adulto estudiado bajo diferentes grados de activación. El resultado se expresa en porcentaje frente a los controles sin calcio.

	<u>% ACTIVIDAD</u>
MgCl_2 10 mM	26
MnCl_2 1 mM	69
MgCl_2 10 mM + NaF 10 mM	46
MnCl_2 1 mM + NaF 10 mM	61

No ha sido posible detectar ningún efecto activador del Ca^{2+} sobre la enzima a bajas concentraciones. A tal fin sería necesario realizar los experimentos en presencia de una calmodulina propia del insecto para comprobar si el Ca^{2+} puede ser en esas circunstancias un modulador positivo de la adenilato ciclasa de Ceratitis capitata como parece serlo en Bombyx mori (398), si bien, en este caso una de las pruebas que se aportan para demostrar el efecto activador del Ca^{2+} es que la enzima se inhibe en presencia de EGTA. En Ceratitis capitata, la enzima no sólo no se inhibe por EGTA sino que se activa ligeramente como se demuestra en la tabla 26.

El que la enzima se active ligeramente en presencia de tan bajas concentraciones de EGTA indicaría que existen en el medio de incubación pequeñas cantidades de algún metal, posiblemente Ca^{2+} , que serían responsables de la inhibición de la enzima.

3.4.2.5. EFFECTO DE LA ADENOSINA

El efecto de la adenosina se ha ensayado sobre la enzima activada por distintos cofactores, de la misma forma que

204

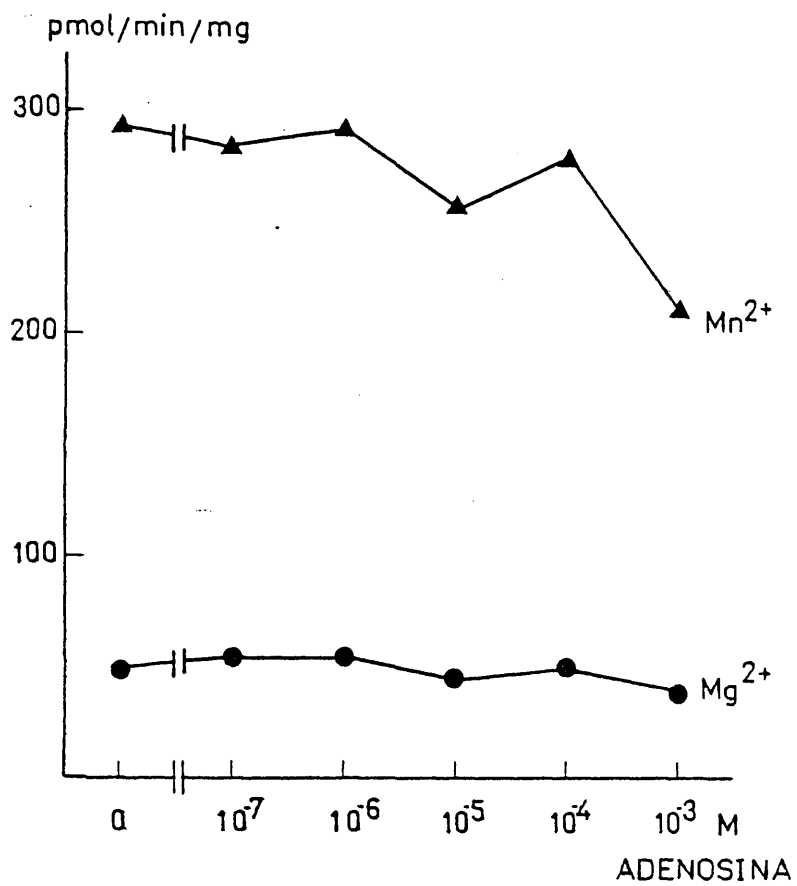


FIGURA 50. Efecto de la adenosina sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de $MgCl_2$ 10 mM o $MnCl_2$ 1 mM. La actividad se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

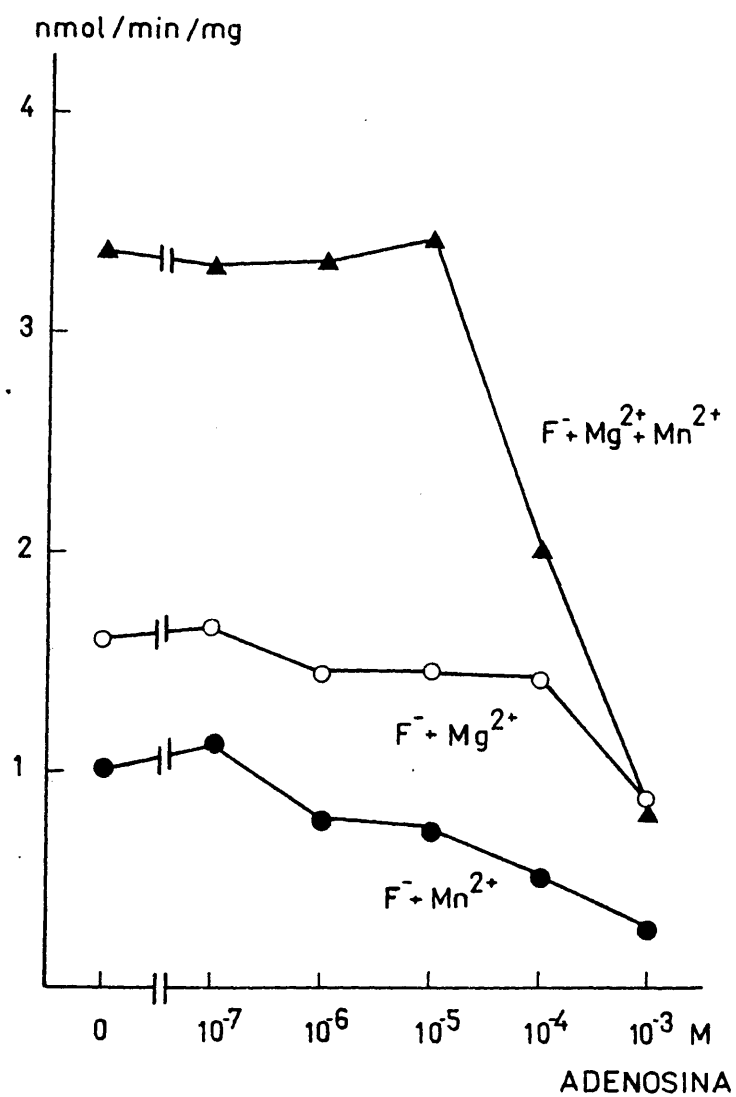


FIGURA 51. Efecto de la adenosina sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de distintos cofactores. La actividad se expresa en nmol cAMP/min/mg proteína.

se hizo con la enzima del adulto farato. Los resultados pueden verse en las figs. 50 y 51.

TABLA 26: Efecto del EGTA 100 μ M y del CaCl_2 88 μ M sobre la adenilato ciclase de la cabeza del adulto de Ceratitis capitata. El resultado se expresa en pmol cAMP/min/mg de proteína.

	<u>-Ca²⁺</u>	<u>+Ca²⁺</u>
Mg ²⁺ 5 mM	91	62
Mg ²⁺ 5 mM + EGTA 100 μ M	107	96

TABLA 27: Efecto de la adenosina 1 mM sobre la actividad de la adenilato ciclase de cabeza de adulto ensayada en presencia de distintos cofactores. Los datos se expresan como porcentaje de inhibición sobre un control sin adición de adenosina.

	<u>% INHIBICION</u>
MgCl ₂ 10 mM	19
MnCl ₂ 1 mM	29
NaF 10 mM + MnCl ₂ 1 mM	72
NaF 10 mM + MgCl ₂ 10 mM	44
NaF 10 mM + MnCl ₂ 10 mM + MgCl ₂ 10 mM	81

En la tabla 27, se recogen los porcentajes de inhibición calculados para una concentración de adenosina de 1 mM. Igual que ocurría con la enzima de adulto farato, la inhibición es superior en presencia de Mn²⁺ que de Mg²⁺ y también a medida que la enzima se halla en un estado de mayor activación. Este dato vie-

ne a confirmar, una vez más la gran importancia que los metales pueden jugar en la regulación de la enzima, ya que el comportamiento de la misma frente a uno u otro efector puede verse alterado en gran medida en función del metal que se encuentra presente en las inmediaciones de la enzima. Para la adecuada interpretación biológica de estos hechos sería necesario conocer las condiciones del microentorno de la enzima.

Para ver en que medida el efecto de la adenosina es o no específico se han llevado a cabo una serie de experimentos utilizando distintas bases, nucleosidos y nucleotidos, como posibles inhibidores de la enzima previamente activada por NaF 10 mM y $MgCl_2$ 10 mM. De los datos de la tabla 28, se deduce que sólo los derivados de adenina son capaces de inhibir la enzima, siendo el orden decreciente del poder inhibidor $ADP > AMP > ADENOSINA > ADENINA$. La interpretación que se puede dar a este hecho es que el sitio inhibidor posee un cierto tipo de requerimientos del anillo de adenina, característica muy importante que podría indicar según Fain y Malbon (164) que la inhibición se realiza a través del sitio "P". En realidad según estos autores la inhibición via sitio "P" podría realizarla el AMP en lugar de la adenosina, hecho que parece estar en absoluta concordancia con nuestros resultados. Sin embargo, cuando se estudió el efecto inhibidor del AMP sobre la actividad de la enzima en presencia de diferentes activadores, tabla 29, se observaron algunas diferencias en principio significativas, entre la inhibición por AMP y por adenosina.

Cuando se ensaya el AMP como inhibidor se observa que la inhibición en presencia de Mg^{2+} es ahora mayor que en presencia de Mn^{2+} y que cuando la enzima está activada por fluoruro la inhibición es menor, al contrario que ocurre con la adenosina. Esto podría indicar que ambos compuestos están actuando a través

TABLA 28: Efecto de distintas bases, nucleosidos y nucleotidos sobre la actividad de la adenilato ciclasa de cabeza de adulto ensayada en presencia de $MgCl_2$ 10 mM y NaF 10 mM. Los datos se expresan como porcentajes de actividad sobre el control sin adición. Las sustancias añadidas se ensayaron en dos experimentos diferentes, el primero de los cuales se hizo con una concentración de efector de 1 mM y el segundo con 0.1 mM

	<u>EXPERIMENTO 1</u>	<u>EXPERIMENTO 2</u>
<u>ADICION</u>	<u>% ACTIVIDAD</u>	<u>% ACTIVIDAD</u>
Nada	100	100
Adenina	91	100
2'-Desoxiadenosina	-	83
Adenosina	48	90
AMP	62	56
ADP	-	46
Guanina	118	104
Guanosina	113	114
Inosina	-	105
Hipoxantina	111	100
Xantina	113	-
Citosina	104	-
5-Metilcitosina	109	-
Citidina	116	-
Uridina	117	-
Timina	110	-

de sitios diferentes o bien que el AMP además de actuar via sitio "P" actuaría a través de otro sitio, posiblemente el centro catalítico. Con respecto a esto es importante observar los resultados de la fig. 52, que representa la cinética de sustrato de la enzima,

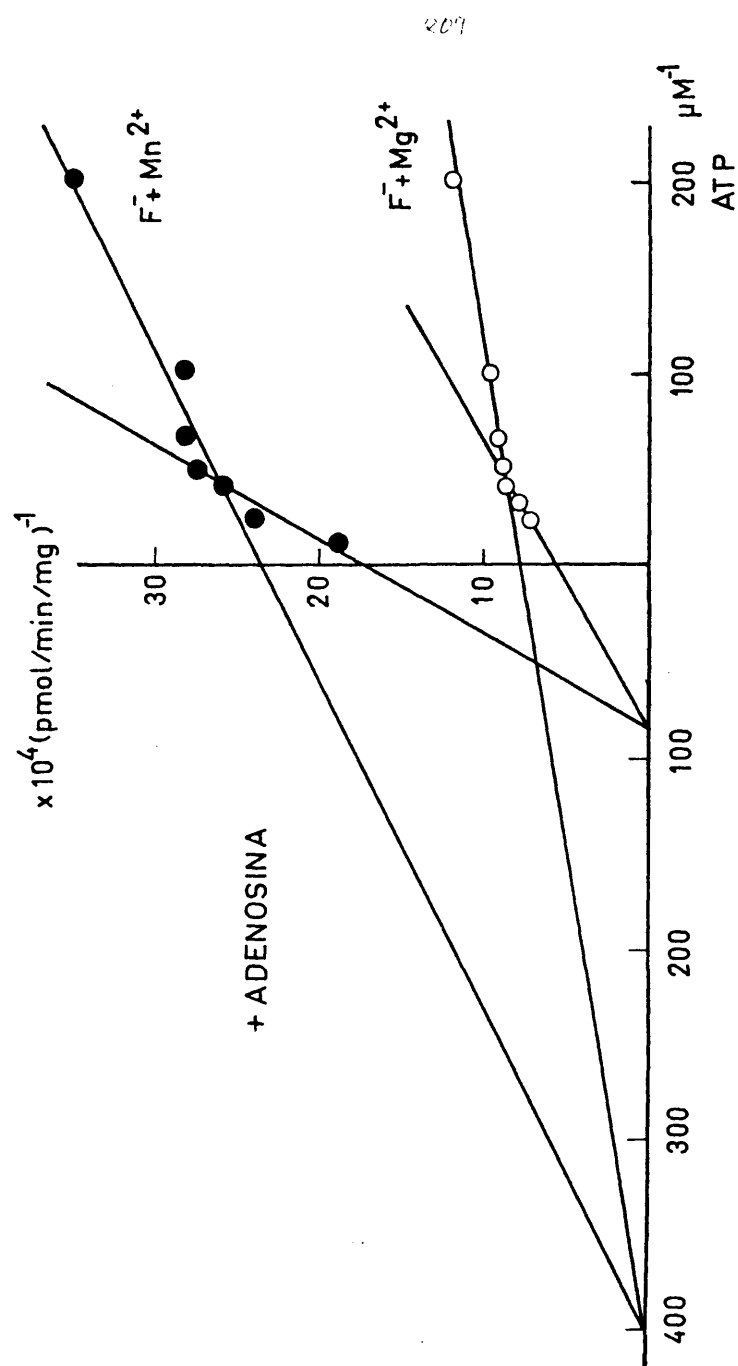


FIGURA 52. Representación de Lineweaver-Burk para la actividad de adenilato ciclasa frente a

ATP en presencia de adenosina 1 mM, NaF 10 mM y MgCl_2 10 mM o MnCl_2 1 mM. La actividad se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

TABLA 29: Efecto del AMP 0.1 mM sobre la adenilato ciclasa de ca
beza de adulto medida en presencia de diferentes cofac
tores. Los datos se expresan como porcentajes de inhi
bición sobre un control sin AMP.

	<u>% INHIBICION</u>
MgCl ₂ 10 mM	41
MnCl ₂ 1 mM	33
MgCl ₂ 10 mM + NaF 10 mM	25
MgCl ₂ 10 mM + GTP 0.1 mM	35
MgCl ₂ 10 mM + GppNHp 0.1 mM	49

determinada en presencia de adenosina 1 mM, NaF 10 mM, con MgCl₂ 10 mM o MnCl₂ 1 mM. Se aprecia claramente dos tendencias claras en la cinética una a bajas concentraciones de ATP y otra a concentraciones altas. Esto indicaría que la acción de la adenosina no responde a un esquema secillo sino que posiblemente es el resultado de la interacción del nucleosido en más de un sitio. Sin ningún género de dudas uno de los sitios posibles para su acción es el centro catalítico en el que sustancias que posean un anillo de adenina en su molécula podrían competir con la unión del complejo Metal-ATP impidiendo de este modo la catálisis. Premont y col (195) han sugerido incluso que el sitio "P" a través del cual se supone mediado este efecto, estaría localizado en el propio componente catalítico y no se descarta la posibilidad de que pudiera incluso tratarse del propio centro activo.

Otros autores han encontrado también cinéticas de inhibición complejas en presencia de adenosina en Bombax mori (396), pulmón de cobaya (471) y tiroides bovino (472).

Actualmente las investigaciones acerca del efecto inhi

bido de la adenosina via sitio "P" se encuentran estacionadas, ya que hasta el momento no se ha podido encontrar una ubicación y un significado coherente para este sitio. Posiblemente el problema se puede solventar mediante técnicas de unión de ligandos que puedan distinguir si existe uno o más sitios accesibles para la misma. En cualquier caso, como se trata de un metabolito con unas características similares a otros muchos metabolitos celulares, adenina, AMP, ADP, ATP, inosina, hipoxantina, etc., se hace difícil cualquier tipo de interpretación de los resultados, debido al gran número de enzimas que podrían utilizarlo de alguna u otra manera como sustrato, cofactor o inhibidor de las mismas y que por lo tanto serían capaces de transformarlo o unirlo en diferentes grados.

3.4.2.6. EFFECTO DEL GTP

El GTP se ha convertido en los últimos años en el centro de atención de todo el complejo sistema de regulación de la adenilato ciclasa y por esta razón se investigó el comportamiento de la enzima en presencia de este nucleótido y de su análogo no hidrolizable GppNHp. En la fig. 53, se muestra la activación de la enzima por ambos compuestos con relación al valor del control considerado como 100% de actividad y constituido por la actividad basal en presencia de $MgCl_2$ 10 mM. Se aprecia claramente que el máximo de actividad se obtiene en ambos casos a 10^{-4} M y que la activación alcanzada por GppNHp es de unas 3 veces superior a la que se consigue con GTP. Este es realmente el comportamiento clásico de todas las adenilato ciclasas que responden a estos nucleótidos, tanto en lo que respecta a su concentración óptima de actuación como a las proporciones relativas entre la activación por GppNHp y GTP. Como dato más próximo a nuestro sistema hay que señalar que Harmar y Horn (406) han estudiado estos efectos en la cucaracha Periplaneta americana, encon

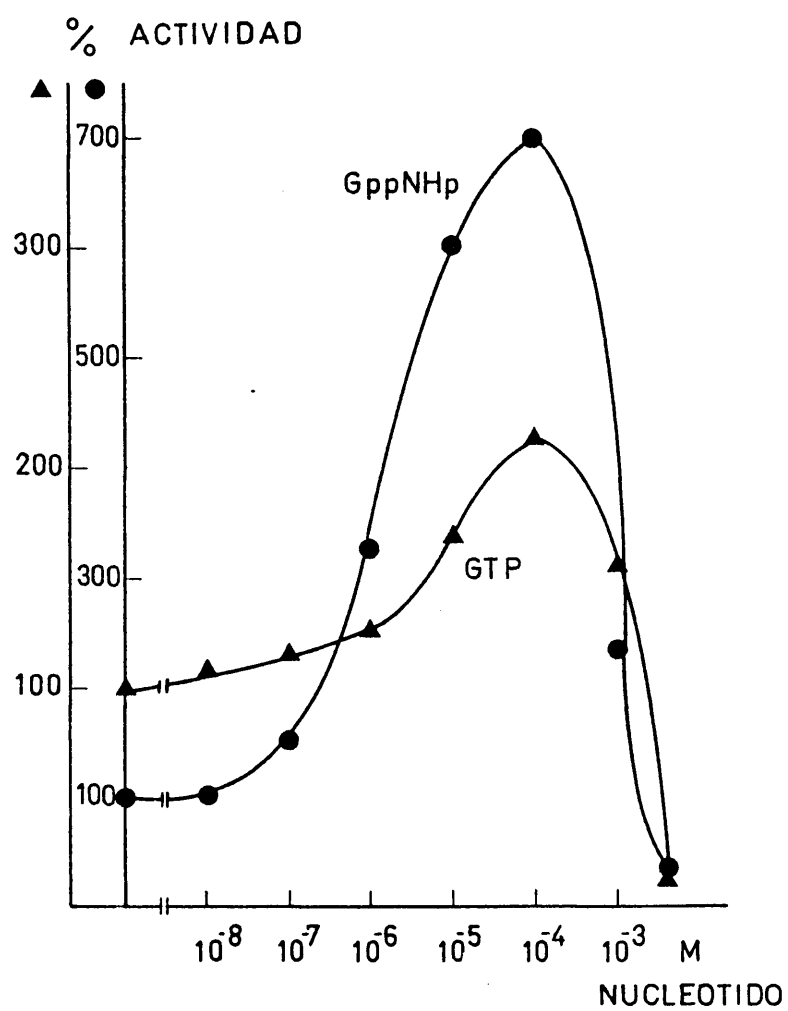


FIGURA 53. Efecto del GTP y GppNHp sobre la actividad de la adenilato ciclasa en presencia de MgCl_2 10 mM.

trando los mismos valores para los máximos de activación. El efecto inhibitor observado al superar la concentración de 10^{-4} M aparte de ser un efecto que se da en otros casos, en los que se ha ensayado por encima de esta concentración (174, 406) es fácilmente explicable si se piensa que estos nucleótidos a concentraciones 20 veces superiores a las del ATP presente en el medio de incubación pueden actuar como inhibidores competitivos del sustrato de la adenilato ciclasa.

Por otra parte se ha estudiado el efecto de la concentración de Mg^{2+} sobre la activación de la enzima por GTP y GppNHp basándose en una idea original de Salomon y col (473), los cuales observaron que al aumentar la concentración de $MgCl_2$ desde 5 mM hasta 10 mM se necesitaba 10 veces mayor concentración de GppNHp para alcanzar la máxima activación y al mismo tiempo los valores absolutos de actividad eran superiores en presencia de 50 mM de $MgCl_2$ que de 5 mM. Esto lo interpretaron suponiendo que la especie molecular capaz de activar la enzima era en realidad el GppNHp libre y no el complejo Mg^{2+} -GppNHp y por ello al aumentar la concentración de Mg^{2+} se necesitaba más GppNHp para activar la enzima. Sin embargo, dejaban sin explicar porqué la activación era superior porcentualmente en presencia de $MgCl_2$ 50 mM, alegando para ello razones poco convincentes acerca de la reducción de las formas libres del sustrato, que se comportarían como inhibidores de la enzima, Hecho que nada tiene que ver con el incremento observado para el GppNHp.

Los resultados que se han obtenido en este sentido en el insecto se muestran en las figs. 54 y 55. Con el GTP se observa que al aumentar la concentración de Mg^{2+} el porcentaje de activación disminuye, en tanto que la K_a permanece constante, del orden de 16 μ M. Teniendo en cuenta que estos datos están referidos a sus respectivos controles sin GTP en presencia de 10 mM y

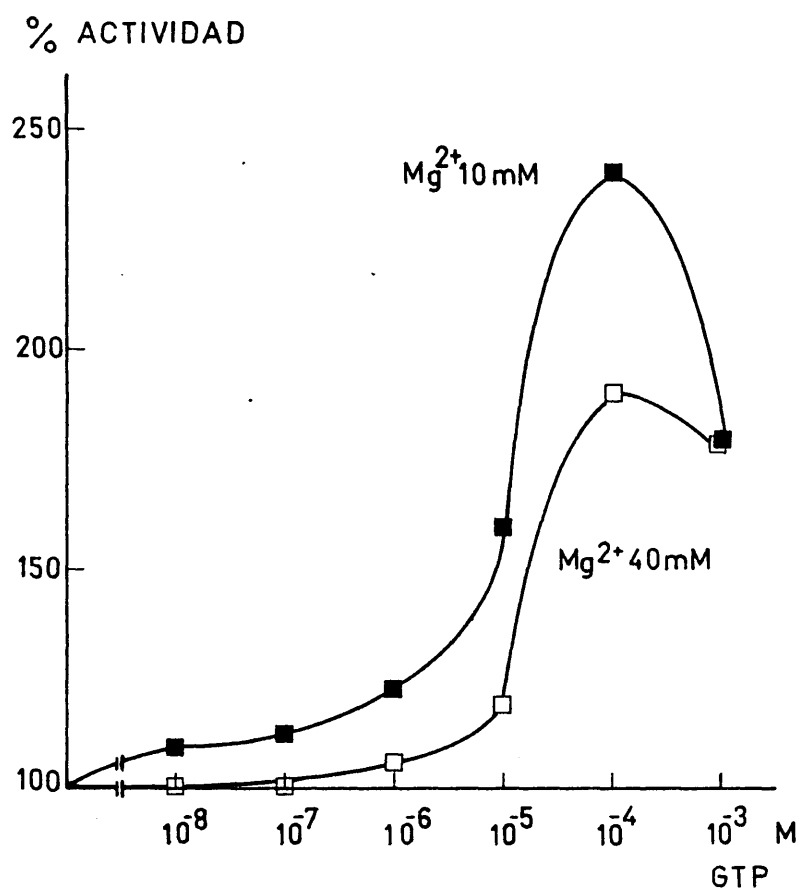


FIGURA 54. Efecto del GTP sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de $MgCl_2$ 10 mM o 40 mM.

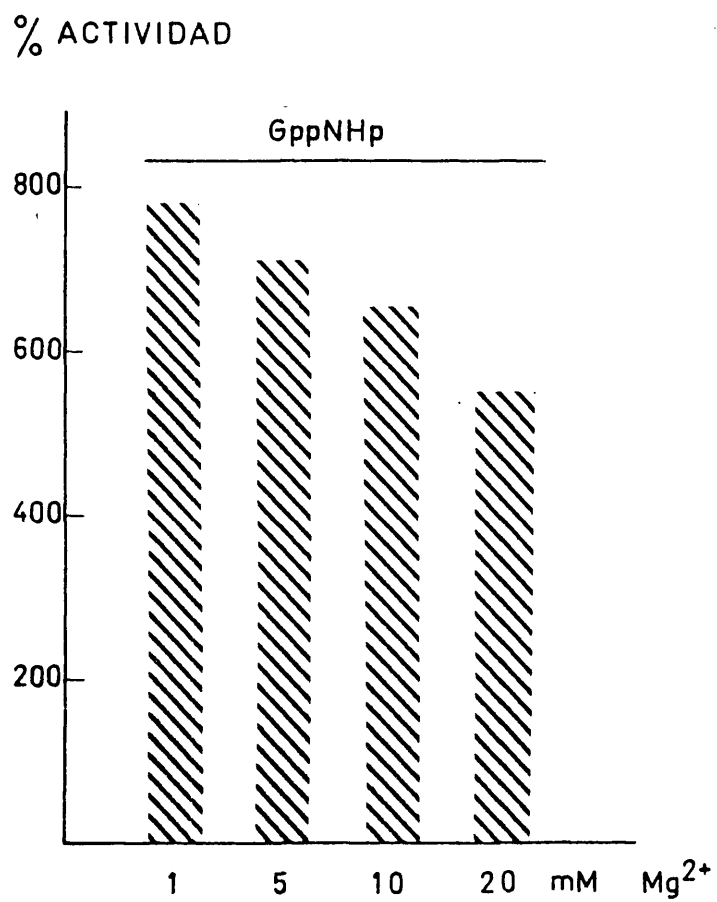


FIGURA 55. Efecto del GppNHp sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de $MgCl_2$ a distintas concentraciones.

40 mM de $MgCl_2$ resulta más coherente con la hipótesis antes apuntada de que al disminuir la proporción de GTP libre se disminuye también la capacidad de activación del nucleótido. Algo parecido ocurre con el GppNHp donde se ve claramente que al aumentar la concentración de Mg^{2+} el porcentaje de activación disminuye, aun en realidad los valores absolutos aumentan, ya que la actividad basal presente un máximo de actividad alrededor de 10 mM de $MgCl_2$. Por lo tanto éstos, junto con otros datos que luego veremos, con firman la hipótesis de Solomon y col, antes apuntada, pero contemplada desde otro punto de vista.

Otro de los estudios interesantes realizados con estos nucleótidos puede observarse comparando las barras negras de las Figs. 57 y 58. Puede apreciarse claramente que el efecto activador del GTP y del GPPNHp es superior en presencia de $MgCl_2$ que de $MnCl_2$. Sólo el GppNHp es capaz de activar ligeramente la enzima en presencia de Mn^{2+} . Por otra parte en las Figs. 42 y 58 puede apreciarse la influencia del Co^{2+} como catión metálico. En este caso la activación por GppNHp es considerable y es del mismo orden que la activación media que se consigue para el Mg^{2+} que viene a ser de unas cinco veces sobre el valor del control de actividad basal. Esto claramente indica una dependencia del metal en el proceso de activación, lo cual podría ser interpretado en dos sentidos. Uno que el metal es capaz de formar un complejo inactivo con el nucleótido, y a tal efecto el Mn^{2+} sería un agente quelante más potente que el Mg^{2+} y el Co^{2+} lo cual estaría en línea con la utilización del GTP al lado del Mn^{2+} , en lugar de Mg^{2+} , en las enzimas que lo utilizan como sustrato. El otro, sería pensar que el Mn^{2+} a través del sitio metálico suministra a la enzima una conformación no óptima para recibir la señal proveniente del componente regulador que une el nucleótido, por lo que éste quedaría sin efecto o apenas sin efecto, aun con el

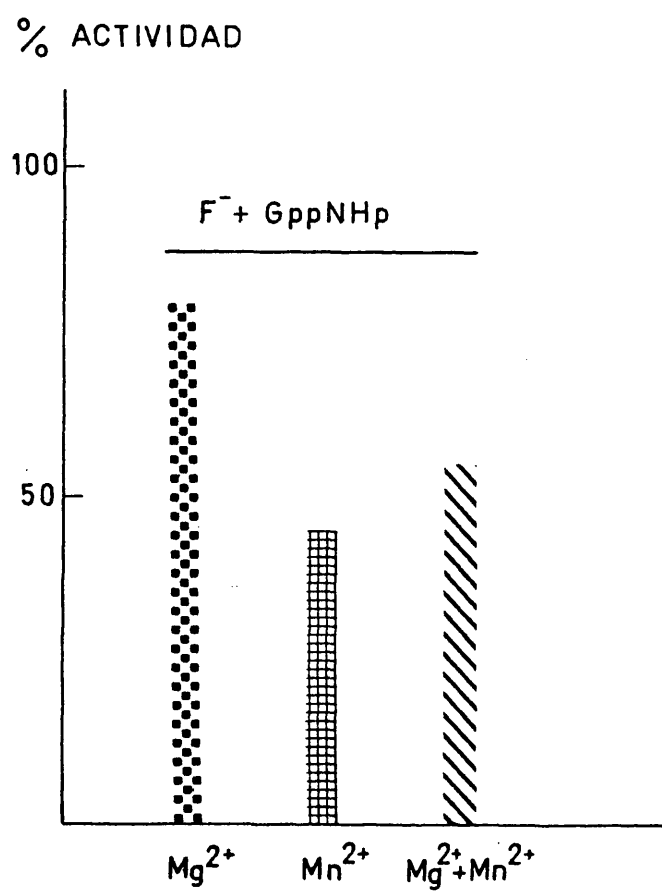


FIGURA 56. Efecto del GppNHp sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de NaF 10 mM.

GppNHp, que es un activador más potente.

Por último, cuando se combinan los efectos del fluoruro y del GppNHp se observa un efecto inhibitor por parte del GppNHp sobre el nivel basal obtenido sólo en presencia de fluoruro. Como se observa en la fig. 56 esta inhibición es dependiente del metal utilizado siendo superior en presencia de Mn^{2+} que en presencia de Mg^{2+} , obteniéndose un efecto intermedio en presencia de ambos. Esto estaría de acuerdo con una competencia del fluoruro y el GppNHp por el mismo sitio de unión o al menos por el mismo componente. Si la activación global es el resultado de la suma de actividades obtenidas con la subunidad ocupada por fluoruro y ocupada por GppNHp, como la actividad que se obtiene con GppNHp es inferior a la que se obtiene con fluoruro, es obvio que la actividad total ha de disminuir y tanto más cuanto menor sea la actividad en presencia de GppNHp, que es lo que exactamente ocurre con el Mn^{2+} con el que como se ha señalado, el nucleotido no actúa como activador. La presencia conjunta del sitio de unión para el GppNHp y para el F^- en el mismo componente, es un hecho sugerido recientemente en diversas preparaciones (57, 334) y los datos aquí aportados confirman este punto de vista.

3.4.2.7. EFFECTO DE LOS NEUROTRANSMISORES

Con objeto de comprobar si las preparaciones de membrana procedentes de la cabeza del adulto podían actuar catalíticamente en respuesta a los neurotransmisores se utilizó la octopamina por su presencia en invertebrados (474, 475), y su potencial carácter de neurotransmisor en insectos (476); efectivamente Nathanson y Greengard han demostrado su efecto activador sobre la adenilato ciclase en homogeneizados de ganglio torácico de Periplaneta americana (187). Una revisión sobre este particular pue-

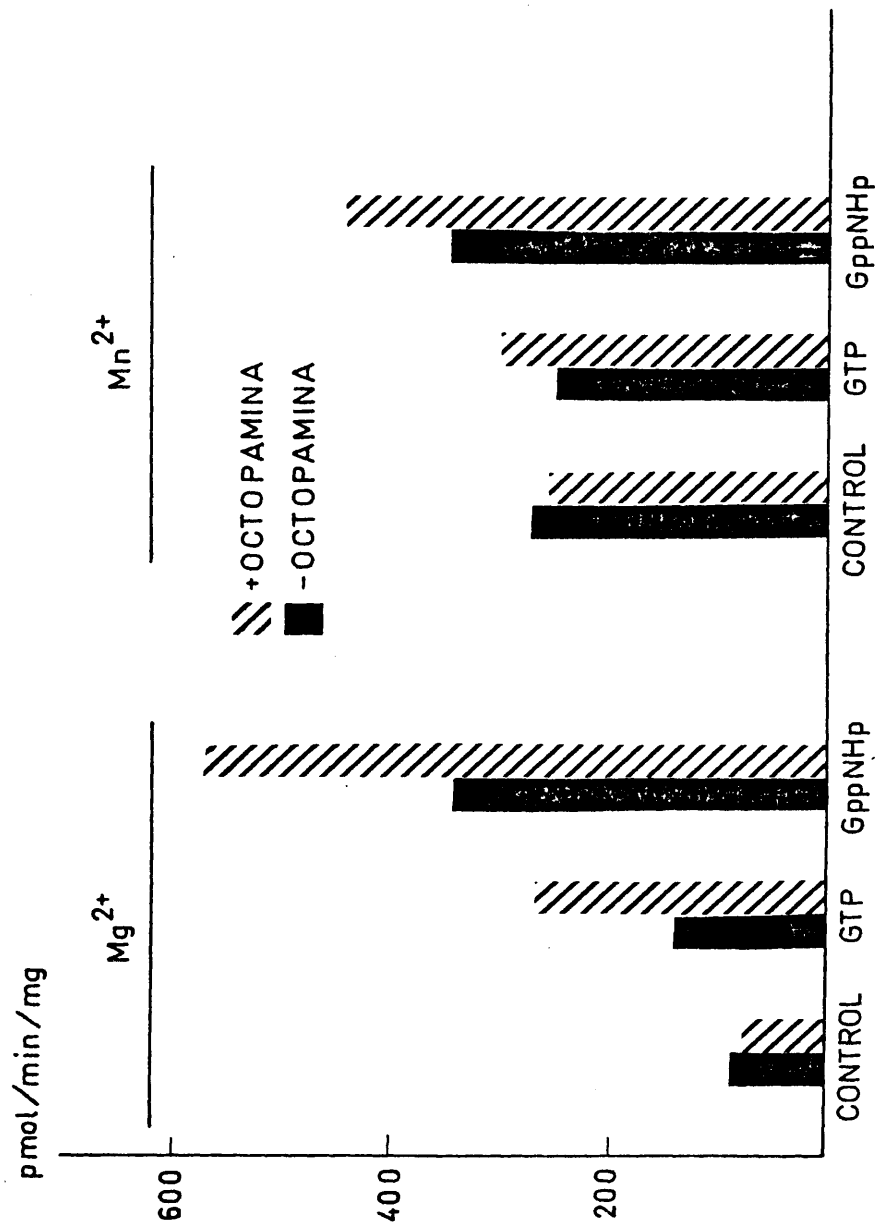


FIGURA 57. Efecto de la octopamina 1 mM sobre la actividad basal de adenilato ciclasa y en presencia de GTP 0.1 mM o GppNHp 0.1 mM, con MgCl₂ 10 mM o MnCl₂ 1 mM.

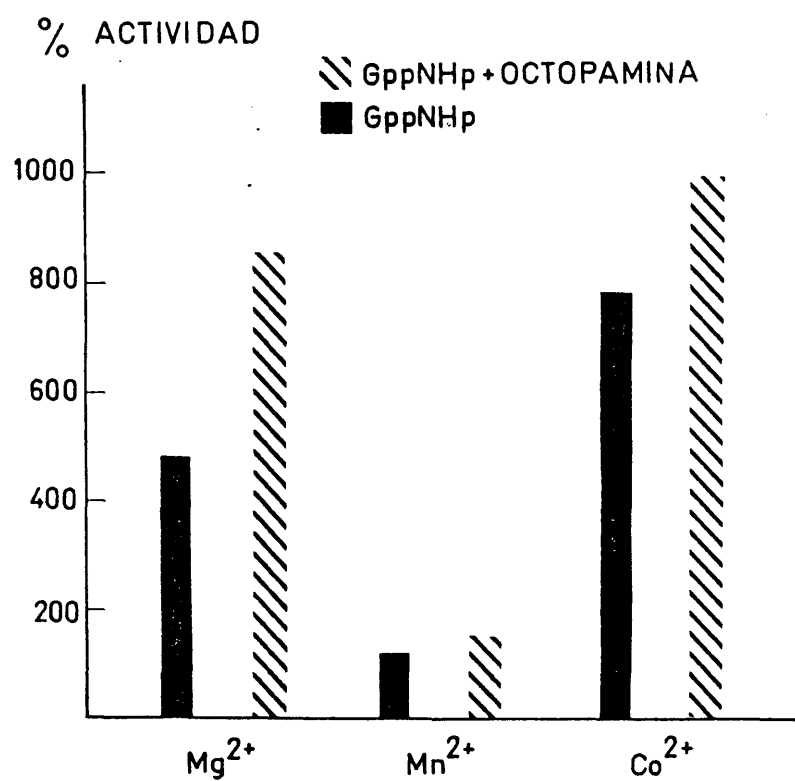


FIGURA 58. Efecto de diferentes cationes, Mg^{2+} 10 mM, Mn^{2+} 1 mM, Co^{2+} 1 mM, sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de GppNHp 0.1 mM, con o sin octopamina 1 mM.

de encontrarse en (404, 401).

En la fig. 57 se aprecia claramente que la octopamina sólo puede ejercer su efecto activador en presencia de GTP o GppNHp lo que está de acuerdo con todos los experimentos que se han realizado hasta el momento con neurotransmisores y en especial, con los experimentos de Harmar y Horn (406) en insectos; también en la misma figura se observa su clara dependencia de Mg^{2+} . Resulta evidente que la enzima en presencia de Mn^{2+} no sólo no responde al GTP sino que incluso apenas responde a la octopamina, hechos estos que podrían correlacionarse a base de un mecanismo de actuación de la octopamina consistente en facilitar el acceso del GTP a la enzima. Con GppNHp, activador más potente, el efecto puede apreciarse en alguna medida. En este mismo orden de hechos resulta interesante comparar en la fig. 58 los efectos activadores de la octopamina 1 mM en presencia de GppNHp 0.1 mM y distintos cationes metálicos, Mg^{2+} 10 mM, Mn^{2+} 1 mM y Co^{2+} 1 mM. Con el Mg^{2+} la octopamina presenta el más alto grado de activación, en tanto que con Mn^{2+} y Co^{2+} el grado de activación es menor y muy parecido entre ambos. Para explicar por qué con el Co^{2+} la octopamina no ejerce un gran efecto activador no podemos recurrir al mismo argumento que se aplicó al Mn^{2+} , ya que según se observa en las figs. 42 y 58, el GppNHp por sí solo es capaz de activar la enzima incluso más que en presencia de Mg^{2+} . En realidad éste puede ser el motivo del pequeño efecto activador de la octopamina ya que en presencia de Co^{2+} se conseguiría saturar el centro de unión del GppNHp y, por lo tanto, apenas podrían unirse nuevas moléculas por efecto de la octopamina. Sobre este particular se verán otros resultados más adelante.

Los estudios de Bodnaryk (405) en Mamestra configurata confirman plenamente nuestros resultados, ya que por una parte la enzima de este insecto puede catalizar la hidrólisis del ATP

en orden creciente de potencia. en presencia de $\text{Co}^{2+} < \text{Mg}^{2+} < \text{Fe}^{2+} < \text{Mn}^{2+}$, siendo ineficaces al Ba^{2+} , Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} y Cd^{2+} . El comportamiento de la octopamina con estos cationes es variable y así el efecto activador es superior en presencia de Mg^{2+} , que en presencia de Co^{2+} y Mn^{2+} y practicamente inexistente en presencia de Fe^{2+} . Estos efectos se han visto también con la adenilato ciclase sensible a dopamina en el "nucleus cadatus" de cerebro de rata (477).

En la fig. 59, se representa la actividad de la enzima en presencia de GTP 0.1 mM y MgCl_2 10 mM, variando las concentraciones de distintos neurotransmisores. Según estos datos sólo la octopamina, noradrenalina y adrenalina son capaces de activar la enzima y especialmente la primera, la cual puede activar la enzima en un 180% a concentraciones del orden de 10^{-5} M. Con la serotonina y la dopamina no se observa efecto alguno en presencia de GTP, sin embargo, en la fig. 60 se aprecia cierto efecto activador de la dopamina y la serotonina en presencia de GppNHp. El que un neurotransmisor no ejerza efecto significaría que en el tejido ensayado o no existen receptores para el mismo o su concentración es tan baja que pasan desapercibidos. Realmente en insectos se han obtenido distintos resultados, así Nathanson y Greengard (187) encuentran en homogeneizados de ganglio torácico de Periplaneta americana que la enzima responde a octopamina, serotonina, dopamina y noradrenalina, en tanto que no lo hace a tiramina, feniletilamina, y feniletanolamina; Bodnaryak (404, 405, 411) en cerebro de Mamestra configurata encuentra un efecto activador por parte de la octopamina, dopamina, noradrenalina, tiramina, feniletilamina, feniletanolamina y no lo encuentra para la serotonina; Rodjakovick y March (395) en cerebro de Gromphadorhina portentosa comprueban el efecto activador de la adrenalina y noradrenalina, aunque no tiene efecto el isoproterenol;

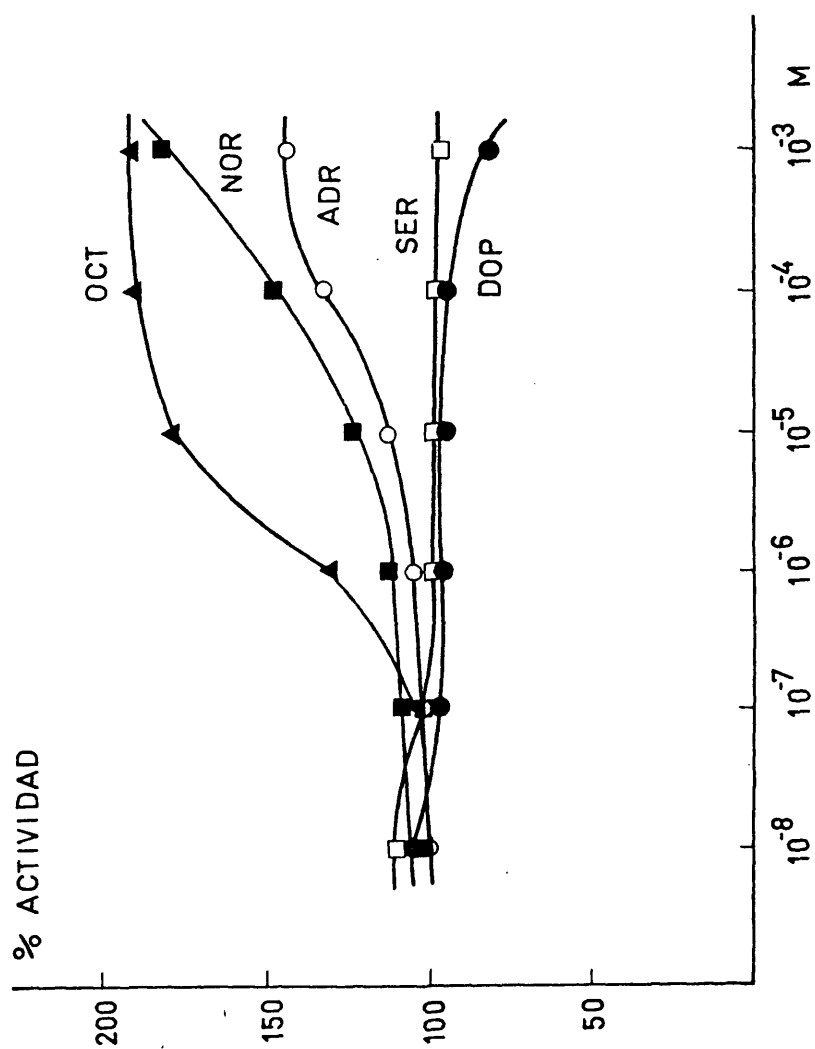


FIGURA 59. Efecto de diferentes neurotransmisores sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de GTP 0.1 mM y MgCl_2 10 mM.

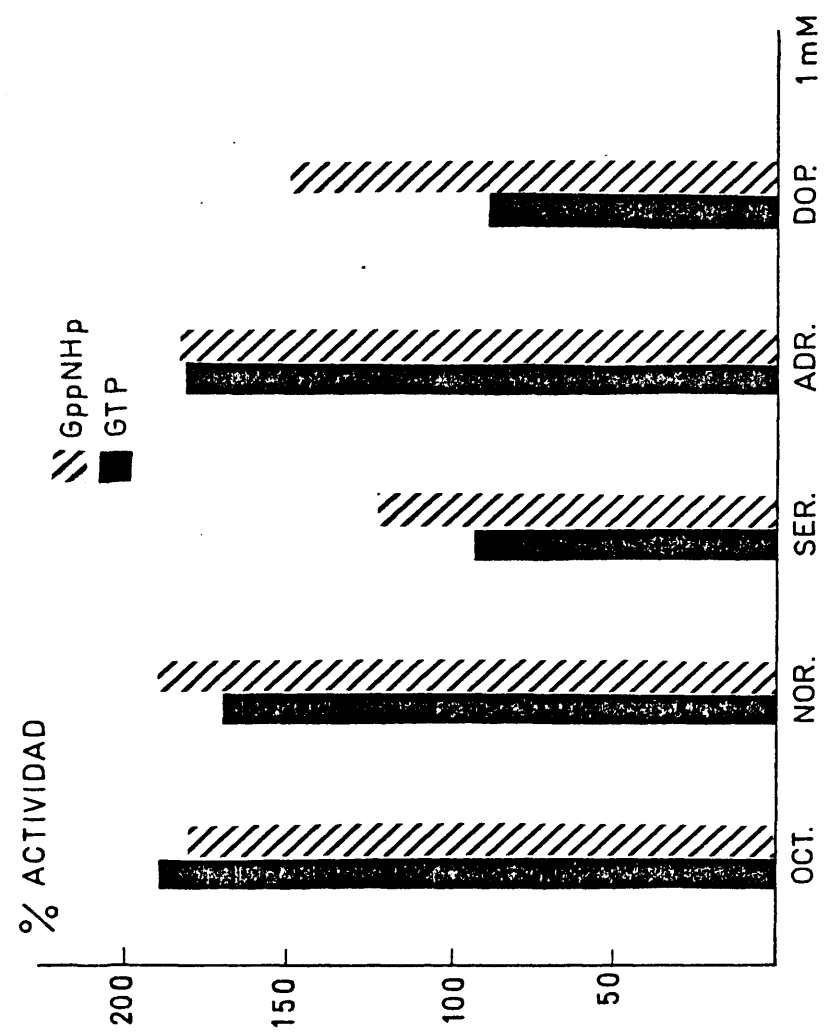


FIGURA 60. Efecto de diferentes neurotransmisores sobre la actividad de adenylyl cyclase en presencia de $MgCl_2$ 10 mM, y GTP 0.1 mM o GppNHP 0.1 mM.

Harmar y Horn (406) en cerebro de Periplaneta americana obserban el efecto activador de la octopamina, adrenalina, noradrenalina, dopamina, isoproterenol, tiramina, feniletanolamina, feniletilamina y algunos otros compuestos relacionados, pero la serotonina no ejerce efecto alguno.

A la vista de estos datos, resulta evidente que las diferencias entre tejidos, el tipo de preparaciones y de métodos hace posible una gran variedad de resultados, si bien, todos coinciden en señalar a la octopamina como el activador mas importante.

El hecho de que en nuestro sistema la dopamina no ejerza efecto alguno a menos que se ensaye en presencia de GppNHp podría indicar que el número de receptores presentes es tan bajo que a menos que se utilice un activador muy potente es imposible apreciar las variaciones en la unión del nucleotido de guanina a la subunidad reguladora. En cualquier caso los ensayos con neurotransmisores u hormonas en presencia de GppNHp son siempre difíciles de interpretar, ya que al no ser un metabolito fisiológico los efectos que se provocan pueden ser el resultado de artefactos experimentales.

Para determinar la existencia de efectos aditivos por parte de estos neurotransmisores con respecto a la activación por octopamina, se preparó un ensayo manteniendo fijas las concentraciones de octopamina 1 mM y GppNHp 0.1 mM y variando la presencia de los restantes neurotransmisores a concentración de 1 mM. Los resultados pueden verse en la fig. 61. Ninguno de los neurotransmisores muestra efecto aditivo, lo que implicaría dos cosas, o bien que no existe más que un único receptor, que sería el receptor de octopamina a través del cual actúan los otros neurotransmisores debido a que presentan ciertas analogías estructurales con la octopamina, o bien siguiendo el modelo de

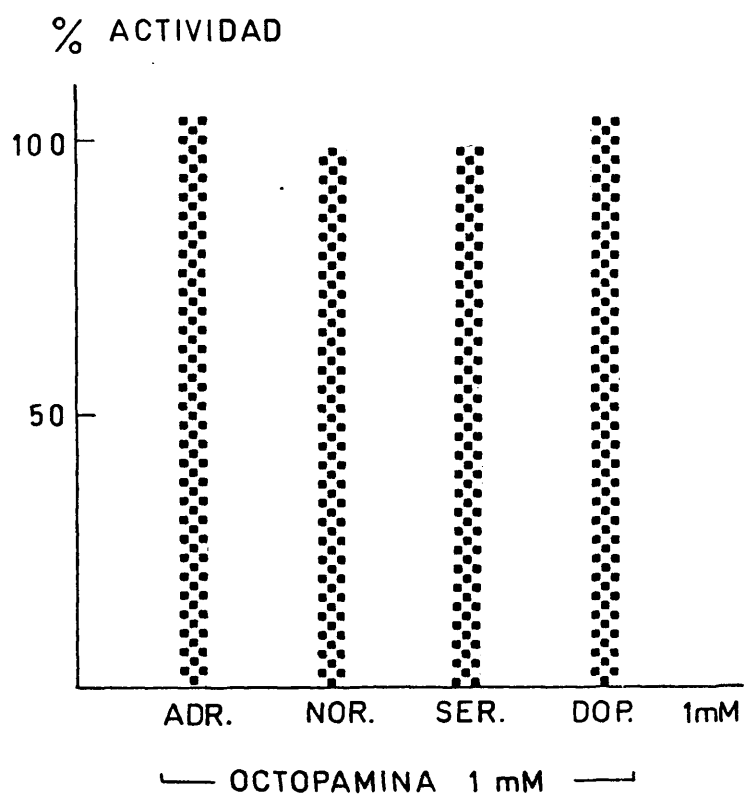


FIGURA 61. Determinación de la aditividad del efecto de diferentes neurotransmisores con el de la octopamina sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de GppNHp 0.1 mM y $MgCl_2$ 10 mM.

Cuatrecasas, la enzima se satura con los receptores de octopamina y no quedan unidades catalíticas disponibles para la acción de los otros receptores. En la bibliografía igual que ocurría con los efectos de los neurotransmisores se recogen opiniones diferentes sobre este tema de la aditividad de los efectos, según que los ensayos se realicen a concentraciones óptimas o subóptimas de los neurotransmisores. Posiblemente existan tres tipos de receptores para octopamina, dopamina y serotonina, pero las proporciones relativas de cada uno de ellos varía según el tejido ensayado. La adrenalina, noradrenalina, tiramina, etc. actuarían a través del receptor de octopamina o dopamina, debido a su similitud con las mismas. De cualquier forma serán los experimentos de unión de los neurotransmisores los que establezcan el número y especificidad de los receptores existentes.

También se ha estudiado en el insecto la respuesta a diferentes sustancias relacionadas estructuralmente con la octopamina en presencia de GTP 0.1 mM. Los resultados se recogen en la fig. 62, de los que se puede concluir, la existencia, en principio de unos requerimientos estructurales específicos:

- 1º. El grupo amino no debe estar sustituido por grupos voluminosos.
- 2º. La presencia necesaria de grupos OH en las posiciones 2 y 4'.
- 3º. El OH en posición 3' dificulta la activación.

Dentro de la activación por neurotransmisores se ha estudiado también el efecto que ejercen distintos agentes bloqueadores sobre la activación por octopamina fig. 63. La fentolamina presenta un efecto bloqueador muy marcado igual que sucede en todos los sistemas en los que se ha estudiado la acción de estos bloqueadores (187, 404, 406). Los efectos de la ciproheptadina y

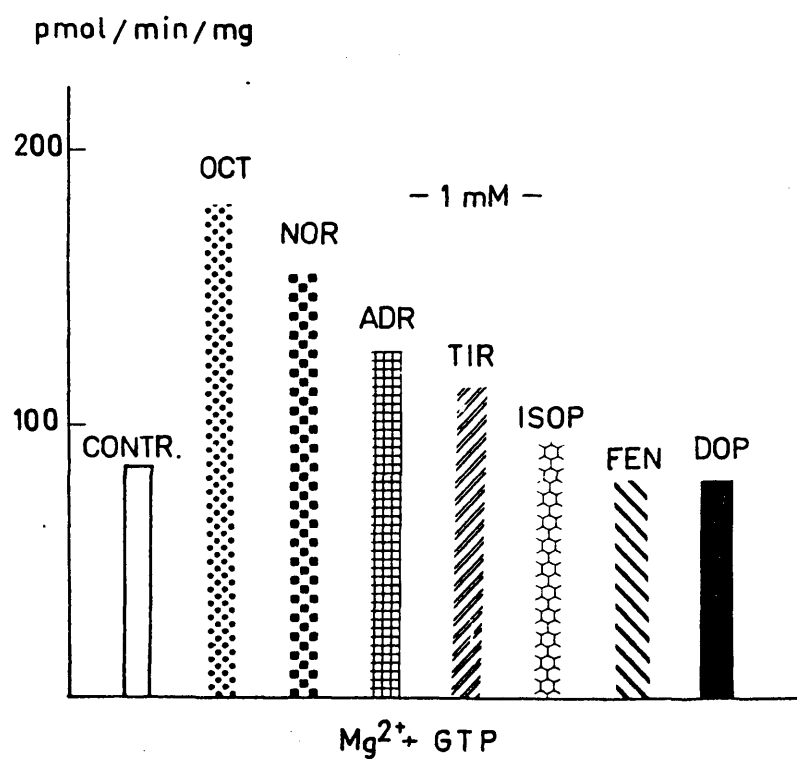


FIGURA 62. Efecto de los derivados de feniletilamina sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de GTP 0.1 mM y MgCl_2 10 mM. La actividad se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

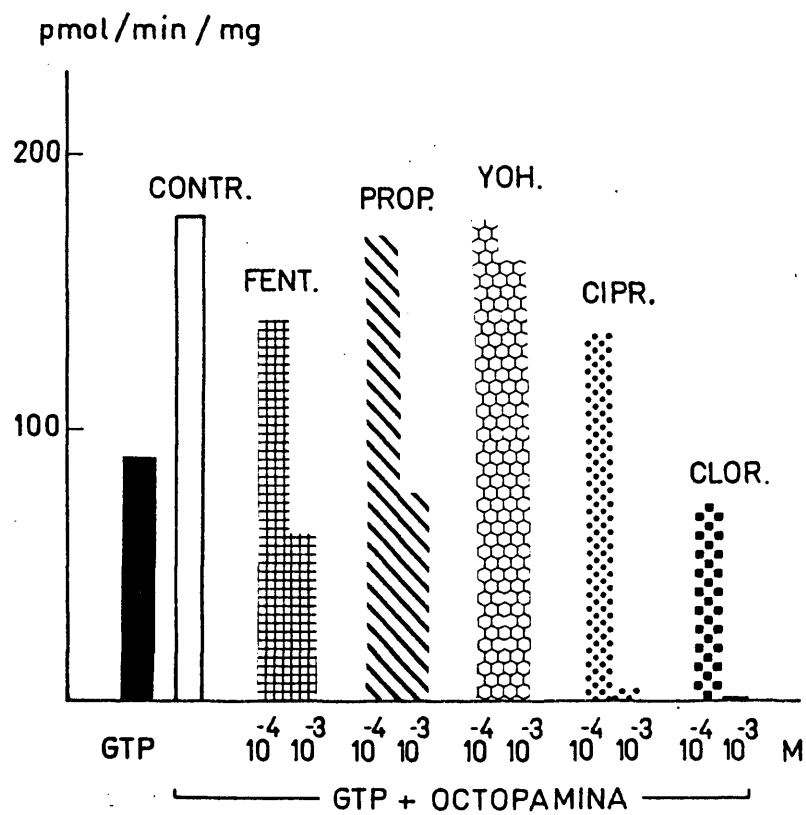


FIGURA 63. Efecto de diferentes fármacos sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de GTP 0.1 mM, octopamina 1 mM y MgCl_2 10 mM. La actividad se expresa en pmol cAMP/min/mg proteína.

y clorpromacina parecen ocurrir como si la inhibición se produce se por otra vía distinta al bloqueo del receptor. La Yohimbina no tiene ningún efecto incluso a concentración 1 mM.

De todo ello se deduce que en el insecto Ceratitidis capitata existe un receptor específico para octopamina, cuyas características son similares a las de otros receptores octopaminérgicos encontrados en insectos (187, 404, 406).

El efecto estimulador de la octopamina y otros neurotransmisores se ha estudiado habitualmente en presencia de GTP, ya que con GppNHp la estimulación es variable y en algunos casos prácticamente nula. Este efecto ha sido observado en Mamestra con figurata (405) y Periplaneta americana (406), donde la relación de actividades + octopamina/- octopamina en presencia de GTP es de 2.5 y en presencia de GppNHp 1.1. En preparaciones de membrana de Ceratitidis capitata se ha podido observar un comportamiento similar (tabla 30)

TABLA 30: Activación de la adenilato ciclasa de cabeza de adulto Ceratitidis capitata por octopamina determinada en presencia de GTP, GppNHp o una mezcla de ambos. Los resultados se expresan en pmol cAMP/min/mg de proteína.

ADICION	RELACION		
	-OCTOPAMINA	-OCTOPAMINA	+OCTOP./-OCTOP.
MgCl ₂ 10 mM + GTP 0.1 mM	144	252	1.7
MgCl ₂ 10 mM + GppNHp 0.1 mM	824	852	1.0
MgCl ₂ 10 mM + GTP 0.1 mM + + GppNHp 0.1 mM	488	720	1.5

La falta de estimulación por octopamina en este caso en

presencia de GppNHp puede ser debida a la saturación del sitio guanídico del componente regulador, de tal suerte que, la octopamina quedaría sin efecto al no poder incrementar la proporción de nucleótido unido. En apoyo de esta hipótesis se ha observado en Ceratitis capitata que si bien con GppNHp 100 μ M no se apreciaba estimulación por octopamina, a 10 μ M, sin llegar a saturación, la estimulación es del 140%.

Por otra parte, de los resultados expuestos en la tabla 30 se desprende que el GTP al competir con el GppNHp por el sitio regulador desatura el sistema y permite que la octopamina lo active. Si se presta atención, se observa que la diferencia entre el estado inicial sin octopamina y el estado activado con octopamina es de 108 pmoles en presencia de GTP y de 232 pmoles en presencia conjunta de GTP y GppNHp. Es evidente que en este último caso en el incremento de actividad debe participar de alguna manera el GppNHp.

3.4.2.8. EFFECTO DE OTROS POSIBLES MODULADORES

Se han ensayado otras sustancias aparte de las que hasta aquí se han comentado, en búsqueda de nuevos efectos activadores.

Birnbaumer y col (61) habían demostrado que el Li^+ ejercía un efecto activador sobre la actividad basal de la adenilato ciclasa de adipocitos y un efecto inhibitor sobre esta misma enzima activada por fluoruro o ACTH. Dousa y Hechter (487) observan una inhibición por Li^+ de la actividad basal y activada por vasopresina de la enzima de médula renal de conejo. El Li^+ también tiene efecto inhibitor sobre la actividad basal y estimulada por fluoruro, histamina y norepinefrina de cerebro de rata (488), sobre la actividad basal de cortex renal de rata (489) y sobre la enzima de tiroides estimulada por TSH sin alterar en este ca

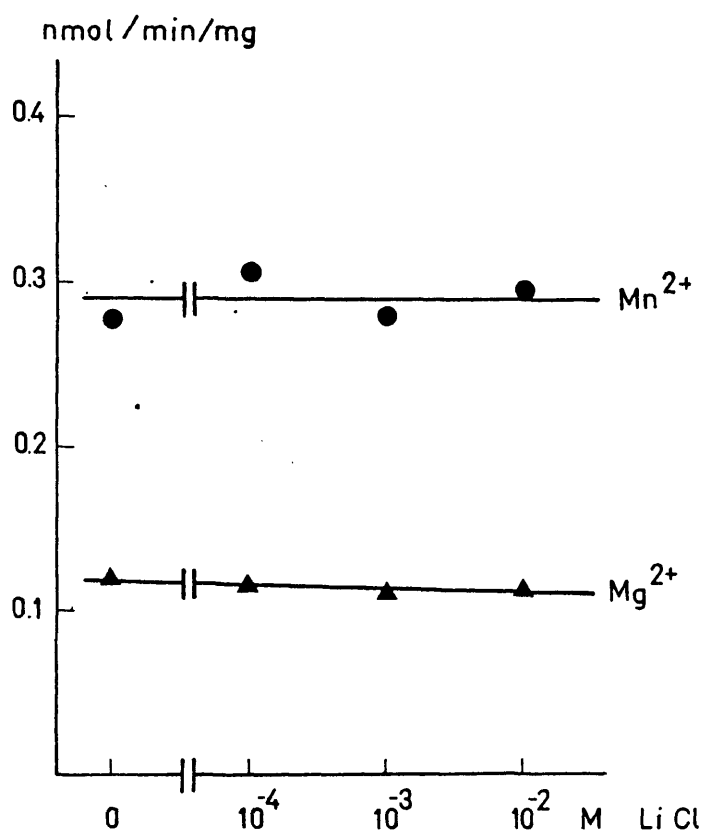


FIGURA 64. Efecto del LiCl sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de $MgCl_2$ 10 mM o $MnCl_2$ 1 mM. La actividad se expresa en nmol cAMP/min/mg proteína.

so la actividad basal (424, 33).

En la enzima de cabeza de Ceratitidis capitata el Li^+ , según se ve en la fig. 64, no ejerce ningún efecto sobre la actividad basal tanto en presencia de MgCl_2 10 mM como de MnCl_2 1 mM.

Se ha probado también el efecto del NaN_3 en las cabezas (tabla 31), pero no se ha observado más que un ligerísimo efecto activador en presencia de NaF 10 mM y MnCl_2 1 mM, por lo que en este sentido la enzima de la cabeza parece comportarse de forma distinta a la enzima del adulto farato. Lo más probable como se comentaba con el adulto farato es que la activación se debiera a causas extrínsecas al sistema de la adenilato ciclasa, como inhibición de alguna enzima, ATPasa, fosfodiesterasa, pirofosfatasa, etc., o a una participación de la guanilato ciclasa, sin descartar tampoco una activación directa. En este caso parece que no concurren ninguna de estas causas, ya que no se detecta activación significativa.

TABLA 31: Efecto del NaN_3 sobre la adenilato ciclasa de cabeza de adulto. Los datos se expresan en pmol cAMP/min/mg de proteína.

ADICION	- NaN_3	+ NaN_3
MgCl_2 10 mM	47 ± 6	52 ± 6
MnCl_2 1 mM	377 ± 6	349 ± 3
MnCl_2 1 mM + NaF 10 mM	594 ± 20	696 ± 40
MgCl_2 10 mM + NaF 10 mM	1 179 ± 11	1 118 ± 80
MgCl_2 10 mM + MnCl_2 1 mM + NaF 10 mM	3 765 ± 69	3 750 ± 151

Los polianiones sulfato de dextrano y sulfato de polivinilo se habian encontrado como inhibidores de la adenilato ciclase ($I_{50} = 3 \mu\text{g/ml}$) de tiroides de bovino tanto de la enzima particulada (144), como soluble (166).

Se probó a tal fin el efecto del poliglutamato como se muestra en la tabla 32, sin que se haya observado ningún efecto inhibidor incluso a una concentración de $125 \mu\text{g/ml}$. Posiblemente el efecto inhibidor observado con los otros polianiones se deba a otro tipo de interacciones con la cadena hidrocarbonada, ya que en otros casos tampoco se ha visto inhibición por poliaspartico (144).

TABLA 32: Efecto del poliglutamato sobre la actividad adenilato ciclase de cabeza de adulto. Los datos se expresan en pmol cAMP/min/mg de proteína.

<u>ADICION</u>	<u>-POLIGLUTAMICO</u>	<u>POLIGLUTAMICO</u> (125 $\mu\text{g/ml}$)
MgCl ₂ 10 mM	105 \pm 7	97 \pm 6
MgCl ₂ 10 mM + NaF 10 mM	1 012 \pm 30	1 072 \pm 47

Es interesante resaltar aquí que Asbury y col (166) han encontrado un fuerte efecto inhibidor de la clorpromacina tanto sobre la adenilato ciclase soluble como particulada de tiroides bovino ensayadas en presencia de GppNHp y TSH. Aunque Wolff y Jones (150) han demostrado por otra parte, un efecto activador de este fármaco sobre la enzima de tiroides estimulada por fluoruro.

La inhibición observada por Asbury y col (166) es casi absoluta con clorpromacina 10^{-3} M, lo que coincide con los datos mostrados en la fig. 63. Esto estaría de acuerdo con la interpre

tación de que la clorpromacina y la ciproheptadina deberían actuar por un mecanismo distinto al de la fentolamina y el propanolol contrariamente a la opinión de Harmar y Horn (406).

3.4.2.9. SOLUBILIZACION Y PURIFICACION

3.4.2.9.1. SOLUBILIZACION

Con objeto de estudiar la enzima fuera de su entorno natural se llevó a cabo su extracción por solubilización de la membrana con detergentes no iónicos, que eran los que hasta el momento mejores resultados habían dado a la hora de solubilizar esta enzima. Se probaron así mismo varias condiciones de solubilización recogiendo los datos en la tabla 33.

TABLA 33: Actividad de la adenilato ciclasa presente en el sobrenadante de 37 000 g después de solubilizar en diferentes condiciones. Los tampones de solubilización son de Tris-HCL 50 mM, pH 7.5 con 2-mercaptoetanol 10 mM. Los resultados se expresan en pmol cAMP/10 min/25 μ l de sobrenadante.

<u>ADICION</u>	Lubrol 0.5% NaF 10 mM MgSO ₄ 5 mM <u>Sacarosa 100mM</u>			Lubrol Triton	
				<u>1%</u>	<u>1%</u>
MnCl ₂ 1 mM	50			7	8
MgCl ₂ 10 mM + NaF 10 mM	13			1	1
MnCl ₂ 1 mM + NaF 10 mM	52			6	9
MgCl ₂ 10 mM + MnCl ₂ 1 mM + NaF 10 mM	33			5	6

Resulta evidente que el mejor sistema de solubilización

lo constituye el Lubrol 0.5% junto con fluoruro, Mg^{2+} y sacarosa. Este medio de solubilización se diseñó recogiendo las sugerencias de los trabajos de Swislocki y Tierney (478) y Young y Stansfield (479, 480), los cuales habían demostrado que solubilizando la enzima en presencia de fluoruro y Mg^{2+} se conseguía estabilizarla y por lo tanto se obtenía una actividad superior.

Se ha estudiado las diferencias que existen entre la solubilización con Triton X-100 o con Lubrol PX en presencia de NaF 5 mM, $MgSO_4$ 5 mM y sacarosa 100 mM (tabla 34).

TABLA 34: Actividad de la adenilato ciclasa presente en sobrenadantes de 105 000 g después de solubilización con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 con 2-mercaptoetanol 10 mM, NaF 5 mM, $MgSO_4$ 5 mM, sacarosa 100 mM y los detergentes indicados. Los resultados se expresan en pmol cAMP/min/mg de proteína.

	<u>LUBROL 0.5%</u>	<u>TRITON 0.5%</u>
$MgCl_2$ 10 mM	164	101
$MnCl_2$ 1 mM	550	-
$MgCl_2$ 10 mM + NaF 10 mM	142	140
$MgCl_2$ 10 mM + $MnCl_2$ 1 mM + NaF 10 mM	424	473

En este caso no se observan apenas diferencias entre la utilización de uno u otro detergente. Aunque si se observan cuando se intenta solubilizar la enzima previa estabilización por preincubación de la fracción particulada con GppNHp y $MgCl_2$ (tabla 35).

Esta forma de solubilización con estabilización por GppNHp había sido sugerida por Rodbell y col (481) y Asbury y col (166) obteniéndose excelentes resultados si se compara con

los datos de la tabla 34.

TABLA 35: Actividad de la adenilato ciclasa presente en sobrenadantes de 105 000 g después de solubilización con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 con 2-mercaptoetanol 10 mM, sacarosa 100 mM y el detergente indicado. Previamente se incubó la enzima en presencia de 160 nmoles de GppNHP y 16 μ moles de $MgCl_2$ por cada ml de suspensión de membranas (10 mg proteína/ml) durante 15 min a 0°C. Los resultados se expresan en pmol cAMP /min/mg proteína

	<u>LUBROL 0.5%</u>	<u>TRITON 0.5%</u>
$MgCl_2$ 10 mM	260	109
$MnCl_2$ 1 mM	858	444
$MgCl_2$ 10 mM + NaF 10 mM	242	119
$MgCl_2$ 10 mM + $MnCl_2$ 1 mM + NaF 10 mM	704	380

La proporción de detergente en relación a la cantidad de proteína que se pretende solubilizar oscila de 3-5 veces peso de detergente/peso de proteína de membrana.

En general, para todos los experimentos se ha utilizado el tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 (25°C), con 2-mercaptoetanol 10 mM, NaF 5 mM, $MgSO_4$ 5 mM, sacarosa 100 mM y Lubrol PX 0.5%, obteniendo como producto solubilizado la proteína del sobrenadante de 105 000 g. En un principio se utilizó como producto de solubilización el sobrenadante de 37 000 g y aunque en la tabla 36 se muestra que prácticamente no existe diferencia en la actividad entre uno y otro sobrenadante se prefirió ultracentrifugar a 105 000 g para evitar posibles contaminaciones de fracción particulada.

De los resultados anteriores se concluye, en primer lu

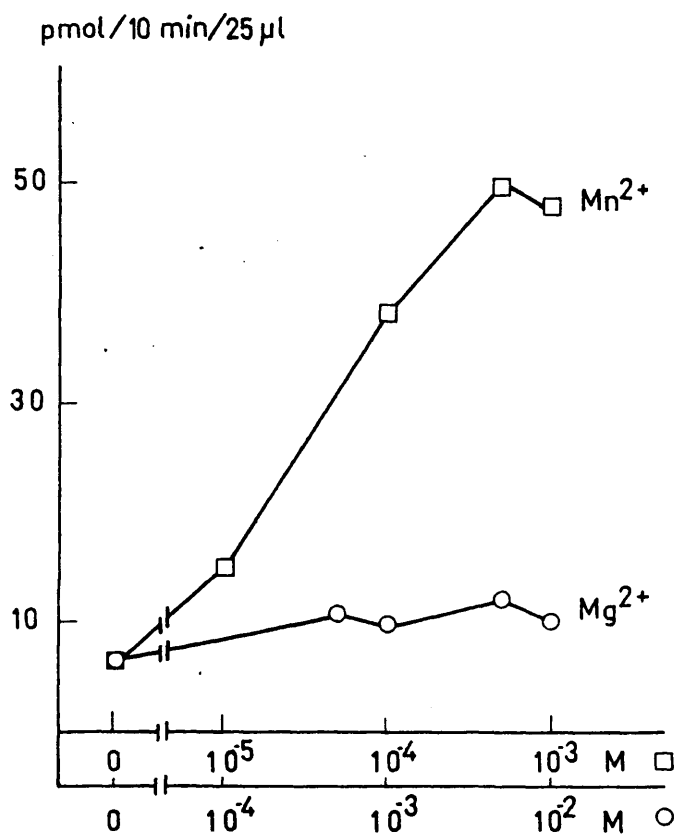


FIGURA 65. Influencia del MgCl_2 o MnCl_2 sobre la actividad de adenilato ciclasa soluble. La actividad se expresa en pmol cAMP/10 min/25 μ l de sobrenadante.

gar, que la enzima presenta mayor actividad en presencia de Mn^{2+} que de Mg^{2+} y como se observa en la fig. 65, el comportamiento frente a este último es relativamente anómalo comparado con la enzima particulada. El NaF a cualquier concentración es incapaz de activar la enzima tanto en presencia de Mg^{2+} como de Mn^{2+} (fig 66). Cuando se incuban juntos Mn^{2+} y Mg^{2+} este último actúa como inhibidor, hecho que contrasta con los datos obtenidos para la enzima particulada.

TABLA 36: Actividad de la adenilato ciclasa en sobrenadantes de 37 000 g y 105 000 g después de solubilización con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 con 2-mercaptoetanol 10 mM, $MgSO_4$ 5 mM, NaF 5 mM, sacarosa 100 mM y Lubrol PX 0.5%. Los datos se expresan como pmol cAMP/10 min/25 μ l de sobrenadante.

ADICION	SOBRENADANTE	SOBRENADANTE
	37 000 g	105 000 g
$MnCl_2$ 0.1 mM	112	102
$MnCl_2$ 1 mM	99	90
$MnCl_2$ 0.1 mM + NaF 10 mM	-	94

Como la solubilización de la enzima se hace en presencia de NaF y $MgSO_4$ hay que tener en cuenta que en el ensayo en ausencia de cualquier otra adición de cofactores ya van incluidos tanto el fluoruro como el Mg^{2+} con una concentración de 0.6 mM. Esto hace por una parte que la enzima presente, por decirlo así, una actividad basal en ausencia de cofactores, pero aparentemente no explica el comportamiento anómalo que se observa con los distintos cofactores. Para eliminar la influencia del Mg^{2+} intrínseco, introducido en la preparación por el tampón de solu-

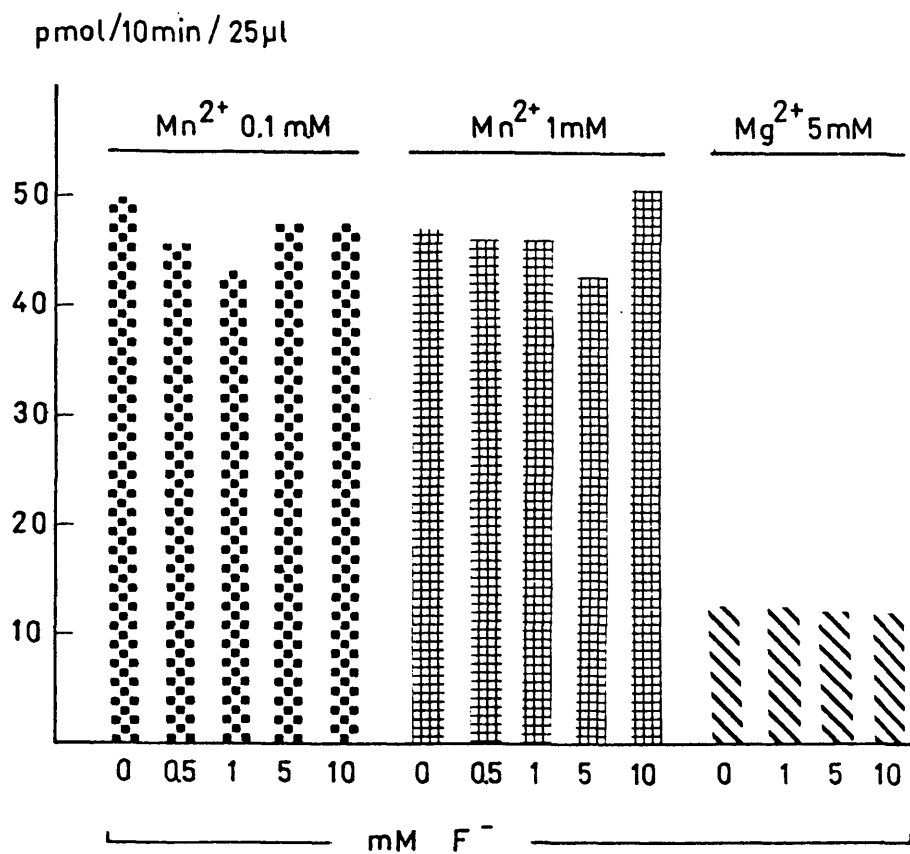


FIGURA 66. Influencia del NaF sobre la actividad de adenilato cicla sa soluble. La actividad se expresa en pmol cAMP/10 min/ 25 μ l de sobrenadante.

bilización, se hicieron una serie de experimentos en presencia de EDTA y otros moduladores (tablas 37, 38, 39).

TABLA 37: Actividad de la adenilato ciclasa presente en sobrenadantes de 37'000 g después de solubilización con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 con 2-mercaptoetanol 10 mM, NaF 5 mM, MgSO₄ 5 mM, sacarosa 100 mM y Lubrol PX 0.5%. Los resultados se expresan en pmol cAMP/10 min/25 μ l de sobrenadante.

ADICION	-EDTA 1 mM	EDTA 1 mM
Sin adición	47	0
MnCl ₂ 1 mM	156	11
MnCl ₂ 2 mM	153	193

TABLA 38: Actividad de la adenilato ciclasa presente en sobrenadantes de 105'000 g después de solubilización con tampón tris-HCl 50 mM, pH 7.5 con 2-mercaptoetanol 10 mM, NaF 5 mM, MgSO₄ 5 mM, sacarosa 100 mM y Lubrol PX 0.5%. Los resultados se expresan en pmol cAMP/10 min/50 μ l de sobrenadante.

ADICION	SIN ADICION	CaCl ₂ 5 mM	NaF 10 mM	CaCl ₂ 5 mM NaF 10 mM
Sin adición	27	1	24	4
MnCl ₂ 1 mM	101	42	150	88
MgCl ₂ 10 mM	24	2	23	3

De todos estos datos se desprende que se puede eliminar la actividad residual mediante adición de EDTA al medio. La concentración de EDTA es suficiente para inhibir la actividad

en presencia de Mn^{2+} 1 mM. Basta incrementar la concentración de Mn^{2+} hasta 2 mM para que se vuelva a recuperar la actividad. La actividad en presencia de $MgCl_2$ 10 mM no sufre variación, ya que queda Mg^{2+} suficiente después de la quelación. En presencia de EDTA tanto con $MnCl_2$ 1 mM y $MnCl_2$ 2 mM como con $MgCl_2$ 10 mM no se aprecia tampoco efecto activador alguno por parte del F^- .

TABLA 39: Actividad de la adenilato ciclasa presente en el sobrenadante de 105 000 g después de solubilizar con tampón Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 con 2-mercaptoetanol 10 mM, NaF 5 mM, $MgSO_4$ 5 mM, sacarosa 100 mM y Lubrol PX 0.5%. Los resultados se expresan en pmol cAMP/10 min/25 μ l de sobrenadante.

ADICION	SIN ADICION	EDTA	$CaCl_2$	Adn.	NaN_3
		1 mM	5 mM	1 mM	1 mM
Sin adición	7	0	0	-	-
$MnCl_2$ 1 mM	47	11	23	10	49
$MnCl_2$ 2 mM	-	56	-	-	-
$MgCl_2$ 10 mM	12	15	2	6	11
$MnCl_2$ 1 mM + NaF 10 mM	52	13	43	-	56
$MnCl_2$ 2 mM + NaF 10 mM	-	64	-	-	-
$MgCl_2$ 10 mM + NaF 10 mM	12	15	5	-	11

En presencia de $CaCl_2$ la enzima experimenta una fuerte inhibición, muy superior en presencia de Mg^{2+} , que de Mn^{2+} , tal como ocurre con la enzima particulada; se observa además, que si se añade fluoruro a la mezcla en presencia de Mn^{2+} se produce una activación de la enzima que llega a ser del 200%. En presencia de Mg^{2+} la actividad es baja y los resultados no son significativos. Pero si en lugar de $CaCl_2$ 5 mM se utiliza

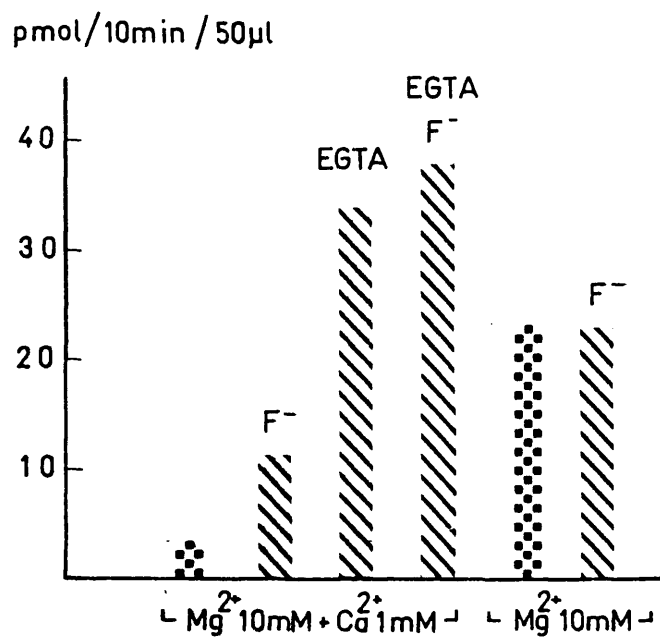


FIGURA 67. Influencia del NaF 10 mM y EGTA 1 mM sobre la actividad de adenilato ciclasa soluble en presencia de $MgCl_2$ 10 mM, con o sin $CaCl_2$ 1 mM. La actividad se expresa en pmol cAMP/10 min/50 μ l de sobrenadante.

CaCl_2 1 mM, el efecto activador del fluoruro se puede observar también con el Mg^{2+} (fig. 67). La interpretación de estos hechos es difícil aunque se podría pensar que, desde un principio, la enzima se encontraría activada por el fluoruro del tampón de solubilización de forma más o menos irreversible. Al añadir el Ca^{2+} éste quelaría el fluoruro y dejaría la enzima en condiciones de poder ser activada de nuevo por el fluoruro. Una interpretación alternativa supondría que el fluoruro disminuye la concentración efectiva del Ca^{2+} en la solución, disminuyendo así su efecto inhibidor, lo que en definitiva supondría que el efecto activador del fluoruro no es otra cosa que una desinhibición basada en la formación de complejos de fluoruro cálcico. En los experimentos recogidos en la tabla 38, se observa un ligero efecto activador por parte del fluoruro; esto podría indicar que está perdiendo algún componente importante para la actividad de la enzima y sólo cuando por alguna circunstancia ese componente no se pierde por completo, es posible observar el efecto activador. Para facilitar la comparación de nuestros resultados con los que ya existían en la bibliografía, se han tabulado estos últimos (tabla 40). En todos los casos se observa una pérdua de sensibilidad al fluoruro y el GppNHp después de la solubilización. Las péridas dependen del grado de pureza con que se haya obtenido la fracción particulada de partida y del tratamiento seguido en la solubilización. Resulta altamente significativo el heho de que en los tratamientos de la enzima con NaF o GppNHp, previamente descritos, antes de proceder a la solubilización no se recogen los datos de actividad basal en ausencia de estos cofactores y en el único caso que eso sucede (tabla 40) se observa una inhibición. Por otra parte, Perkins (51) señala que al solubilizar la enzima ésta pierde la capacidad de ser activada por

TABLA 40: Activación por NaF y GppNHP de la adenilato ciclasa soluble. Distintas procedencias.

<u>DETERGENTE</u>	<u>SOBRENADANTE (g)</u>	<u>%ACTIVACION POR NaF</u>		<u>%ACTIVACION POR GppNHP</u>		<u>REFERENCIA</u>
		<u>PARTICULADA</u>	<u>SOLUBLE</u>	<u>PARTICULADA</u>	<u>SOLUBLE</u>	
Lubrol 12A9 20 mM	10 000	-	240	-	555	482
Lubrol PX 1%	200 000	450	202	-	-	483
Lubrol PX 1%	100 000	1 089	226	795	188	484
Lubrol PX 20 mM	12 000	362	294	-	-	174
Lubrol PX 100 mM	105 000	146	130	-	-	478
Lubrol PX 1%			132		133	
Lubrol PX 1% (GppNHP)	105 000	1 900	80	1 548	-	479
Triton X-100 1%			112		-	
Digitonina 1%			133		-	

fluoruro. Además la enzima soluble de testículo de rata (35, 348) tampoco responde al fluoruro, como tampoco lo hacen, por norma general las enzimas solubles de bacterias como se vio en la introducción. Nuestros datos a la vista de todo este conjunto de resultados vendrían a significar que la enzima al ser solubilizada pierde su capacidad de respuesta al fluoruro, o bien, por pérdida de alguna subunidad, o bien, por bloqueo de ésta.

Igual que ocurre con el fluoruro, sucede con la respuesta al GppNHp y hormonas o neurotransmisores (tabla 41).

TABLA 41: Actividad de la adenilato ciclasa en el sobrenadante de 105 000 g procedente de la solubilización de la fracción particulada de la interfase 1.0 M del gradiente de sacarosa con Tris-HCl 50 mM, 2-mercaptoetanol 10 mM, sacarosa 100 mM y Lubrol PX 0.5%. La fracción fue tratada previamente con GppNHp en las mismas condiciones que la preparación de la tabla 35. Los datos se expresan en pmol cAMP/10 min/25 μ l de sobrenadante.

	<u>ACTIVIDAD</u>
MgCl ₂ 10 mM	10
MnCl ₂ 1 mM	32
MgCl ₂ 10 mM + NaF 10 mM	10
MnCl ₂ 1 mM + NaF 10 mM	35
MnCl ₂ 1 mM + Na ₂ MoO ₄ 1 mM	34
MnCl ₂ 1 mM + MgCl ₂ 10 mM + Na ₂ MoO ₄ 1 mM	22
MgCl ₂ 10 mM + Octopamina 1 mM	10
MgCl ₂ 10 mM + GppNHp 0.1 mM	9
MgCl ₂ 10 mM + GppNHp 0.1 mM + Octopamina 1 mM	9

En este caso se eligió la fracción particulada más pura como material de solubilización para incrementar la posibilidad

217

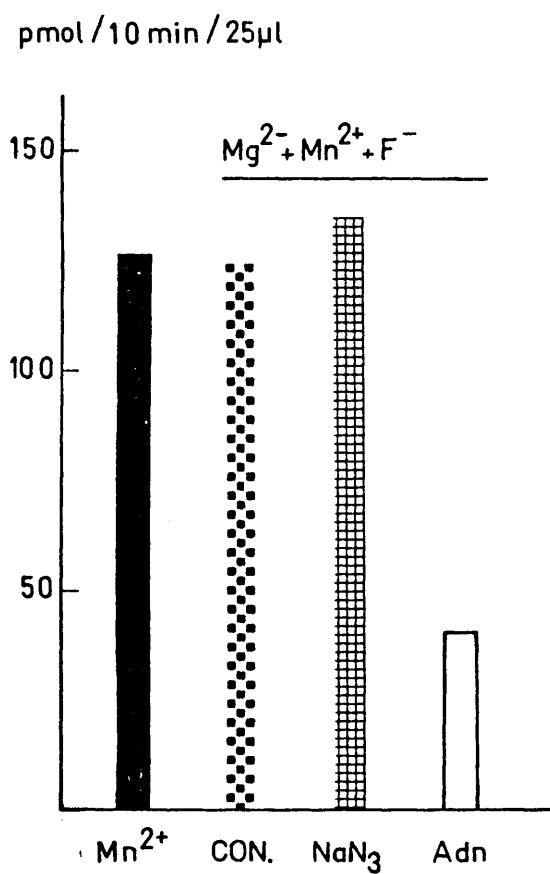


FIGURA 68. Efecto de la adenosina 1 mM y NaN₃ 1 mM sobre la actividad de adenilato ciclasa soluble en presencia de MgCl₂ 10 mM, MnCl₂ 1 mM y NaF 10 mM. La actividad se expresa en pmol cAMP/10 min/25 μ l de sobrenadante.

dad de ver algún efecto por parte de distintos activadores. En modo alguno pudo verse un efecto activador superior al del Mn^{2+} , ni siquiera en presencia de Na_2MoO_4 que como se comprobó es mucho más potente como activador en presencia de Mn^{2+} que el propio NaF, cuando se ensaya la enzima de fracción particulada.

En la fig. 68 y la tabla 39 se puede ver el efecto que ejercen adenosina 1 mM y NaN_3 1 mM sobre la enzima soluble, en diferentes condiciones experimentales. La adenosina actúa de inhibidor igual que lo hacía sobre la fracción particulada, en tanto que, el NaN_3 no ejerce ningún efecto, al contrario de lo que ocurría con la fracción particulada de adulto farato. La acción de la adenosina estaría de acuerdo con la interpretación de que el nucleosido actuaría via sitio "P", ya que la propiedad de actuar sobre la enzima soluble es una característica exclusiva del efecto de la adenosina via sitio "P". Posiblemente la acción de la adenosina en este caso sea exclusivamente a través del centro catalítico.

3.4.2.9.2. PURIFICACION

El primer paso de purificación después de la solubilización de la enzima fue la eliminación del detergente que como había sido descrito, se comporta como un inhibidor de la enzima (174). Para ello se utilizó una resina. El Bio-Beads SM2, que como ya se describió puede retener el detergente sin afectar a la proteína. Los resultados de este tratamiento pueden verse en la tabla 42.

Resulta evidente que después de eliminar el detergente se gana actividad como sería de esperar si el Lubrol PX se comportase como un inhibidor.

Con este procedimiento no se consigue ninguna purificación real, ya que la cantidad de proteína se mantiene practi-

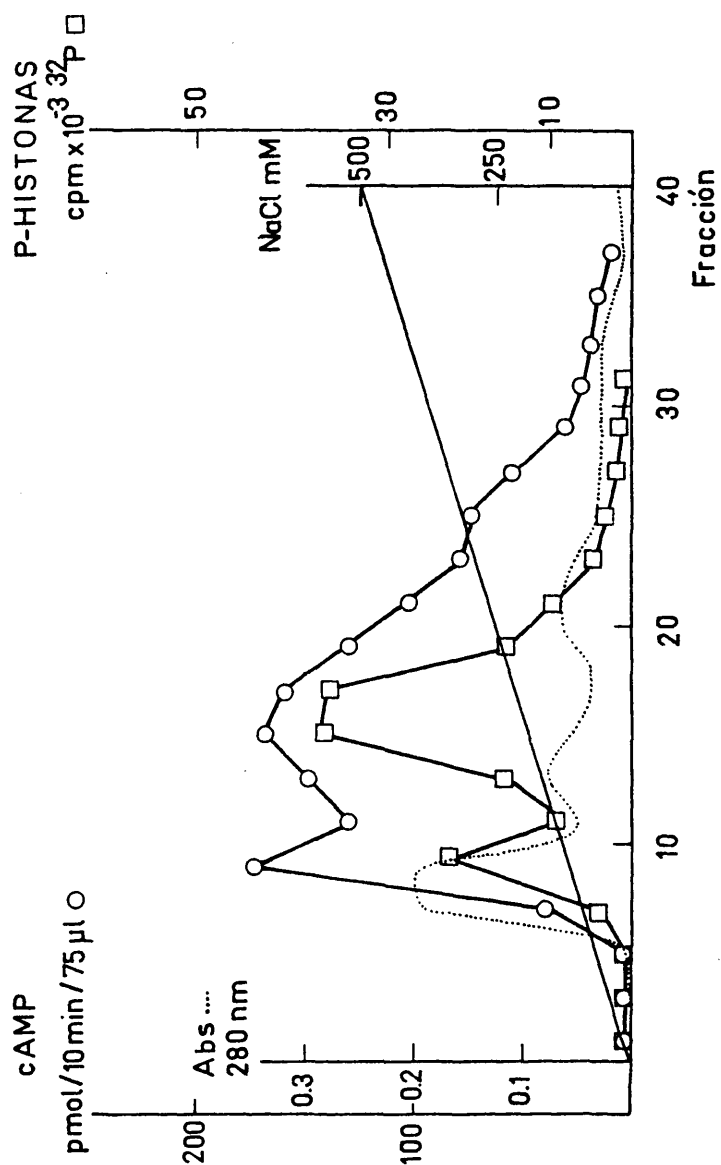


FIGURA 69. Perfil de elución de la cromatografía en DEAE-celulosa de la adenilato c[
clasa y proteína quinasa solubilizadas de membranas de cabezas de adulto.

camente constante después del tratamiento.

TABLA 42: Efecto de la eliminación del detergente después de solubilizar la adenilato ciclasa con Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, 2-mercaptoetanol 10 mM, NaF 5 mM, MgSO₄ 5 mM, sacarosa 100 mM y Lubrol PX 0.5%. El ensayo se realizó en presencia de MnCl₂ 1 mM. Se utilizó una columna de Bio-Beads SM2, 30 x 0.9 cm. El tampón de elución es el tampón de solubilización sin Lubrol PX.

	<u>ACTIVIDAD TOTAL (pmol cAMP/10 min)</u>
SOBRENADANTE 37 000 g	77 400
TRATADA CON BIO-BEADS SM-2	285 600

Otra forma de eliminar el detergente es cromatografiar el sobrenadante de ultracentrifugación a través de una columna de DEAE-celulosa. En la fig. 69 se muestra el resultado de la elución utilizando para ello un gradiente de NaCl desde 0-500 mM con una columna de 1.5 x 10 cm recogiendo fracciones de 2.5 ml. Se observan dos picos de adenilato ciclasa y dos picos de proteína quinasa de membrana dependiente de cAMP. El primer pico puede ser debido a productos de agregación o a partículas de membrana que no hayan sido sedimentadas, ya que en este caso la proteína soluble procede del sobrenadante de 37 000 g. En este sentido observese la tabla 43, que corresponde a la fig. 70.

De los datos se deduce que la actividad excluida del DEAE se puede eliminar si previamente se ultracentrifuga la muestra. Se observa también que el máximo de actividad se logra en la fracción de NaCl 0.1 mM. Con el pico 3B se realizaron pruebas de respuesta a los metales y al flucruuro y el resultado se puede ver en la tabla 44.

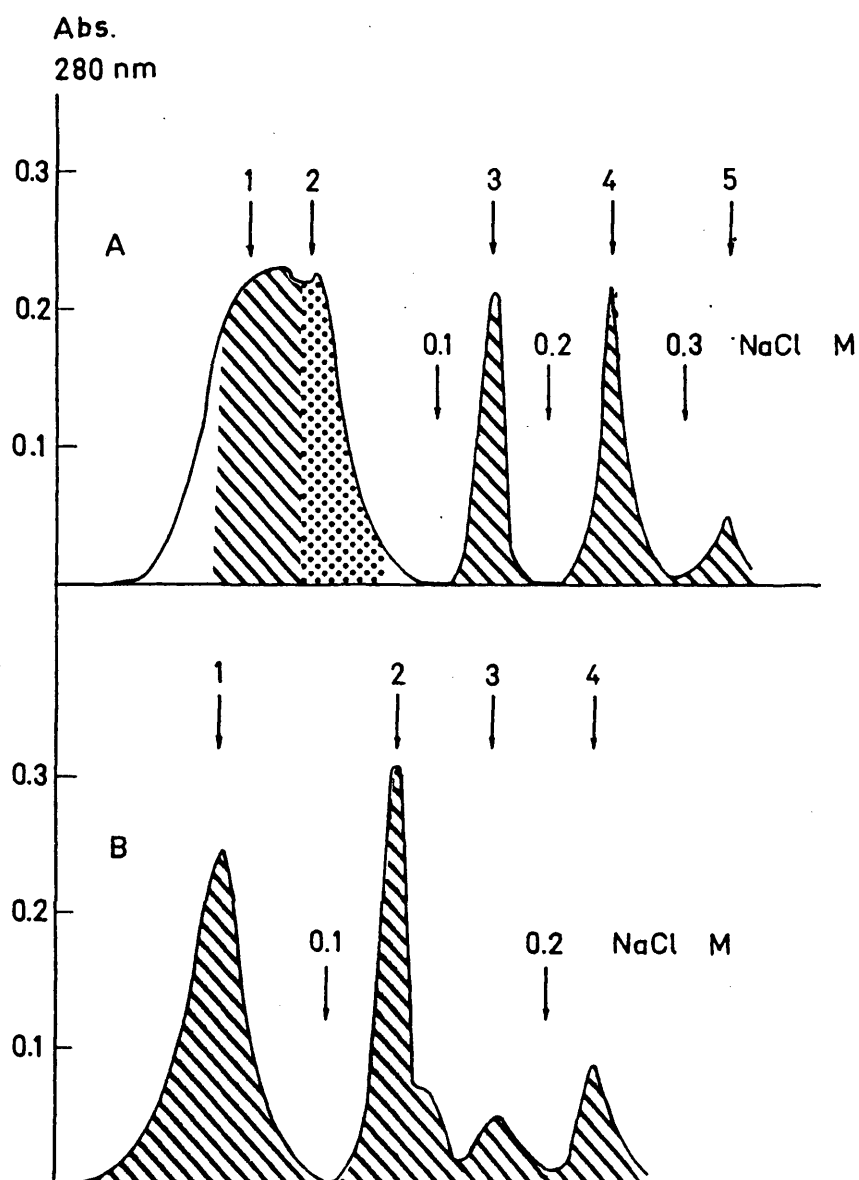


FIGURA 70. Perfiles de elución de cromatografías en DEAE-celulosa de adenilato ciclasa soluble procedente del sobrenadante (A) 37 000 g y (B) 105 000 g.

TABLA 43: Actividad de adenilato ciclasa en los picos obtenidos por elución con un gradiente discontinuo de NaCl de una columna de DEAE-celulosa (0.6 x 10 cm) cargada con adenilato ciclasa soluble procedente del sobrenadante de 37 000 g (A) y 105 000 g (B).

Nº DE PICO	A (pmol cAMP/10 min/100 µl)	B (pmol cAMP/10 min/50 µl)
1	14	0
2	68	56
3	231	0
4	71	21
5	12	-

TABLA 44: Efecto de los cationes y el fluoruro en la actividad de la adenilato ciclasa obtenida en la fracción correspondiente al pico 3B de la fig. 70 del eluido de una columna de DEAE-celulosa. La actividad se expresa en pmol cAMP/10 min/50 µl de eluido.

ADICION	ACTIVIDAD
MgCl ₂ 10 mM	17
MnCl ₂ 1 mM	56
MgCl ₂ 10 mM + NaF 10 mM	15
MnCl ₂ 1 mM + NaF 10 mM	59

Tampoco se aprecia efecto activador alguno por parte del fluoruro y el Mn²⁺ sigue siendo más potente que el Mg²⁺ para la catálisis.

Por último, en la tabla 45 puede verse un esquema de purificación para la adenilato ciclasa de la cabeza del adulto.

Estos valores de actividad antes de la solubilización

TABLA 45: Purificación de la adenilato ciclasa de cabeza de adulto del díptero *Ceratitis capitata*. Las 4 primeras etapas se ensayaron en presencia de $MgCl_2$ 10 mM, $MnCl_2$ 1 mM y NaF 10 mM y las 3 últimas sólo con $MnCl_2$ 1 mM.

ETAPA	PROTEINA (mg)	ACTIVIDAD ESPECIFICA (pmol cAMP/min/mg proteína)	ACTIVIDAD TOTAL (pmol cAMP/minx10 ⁻³)
HOMOGENEIZADO	2 660	233	620
SOBRENADANTE 2 000 g	1 170	352	412
SEDIMENTO 37 000 g	242	970	235
SEDIMENTO 1.5 M SACAROSA	67	1 139	76
SOLUBILIZACION			
Ultracentrifugación	24	192	5
Bio-Beads SM-2	20	467	9
Pico-DEAE-celulosa 0.1 M NaCl	2	1 995	4

se han obtenido activando al máximo la enzima con MgCl_2 10 mM, MnCl_2 1 mM y NaF 10 mM en tanto que la enzima soluble sólo se puede activar por MnCl_2 . Los valores de la tabla 45 no se han calculado pues, para actividades basales, para las que sin duda en las cuatro primeras etapas se obtendrían valores mucho más bajos. Por lo tanto, si se expresan actividades basales, se pueden obtener diferentes valores para el número de veces de purificación y por ello hay que estudiar la tabla solamente como punto de referencia de la marcha de la purificación, desde un punto de vista semicuantitativo.

Aparte de estos métodos se ha utilizado Blue-Sepharosa CL-6B para la purificación según el método de Stellwagen y Baker (55) quienes utilizaban Blue-dextran-Sepharosa como cromatografía de afinidad para purificar la adenilato ciclasa de cerebro de bovino, eluyéndola con ATP. Los resultados hasta el momento no han sido satisfactorios, ya que la enzima se retiene en la columna con mucha fuerza o se desactiva, ya que es imposible recuperar la actividad.

La cromatografía en Biogel HTP tampoco ha dado buenos resultados pues la enzima pierde mucha actividad.

3.4.2.9.3. DETERMINACION DEL PESO MOLECULAR APARENTE

Para determinar el peso molecular de la enzima soluble se ha utilizado el Ultrogel AcA 22 según se describe en el apartado de materiales y métodos.

En la fig. 71, se observa el patrón de elución de una muestra de enzima soluble que procede del sobrenadante de 37 000 g después de haber sido tratado con Bio-Beads SM-2. Se observan dos picos de actividad, uno que eluye con el volumen de exclusión y otro más retrasado que cromatografía en el mismo lugar que la tiroglobulina (tabla 46). Se ha mantenido el gráfico

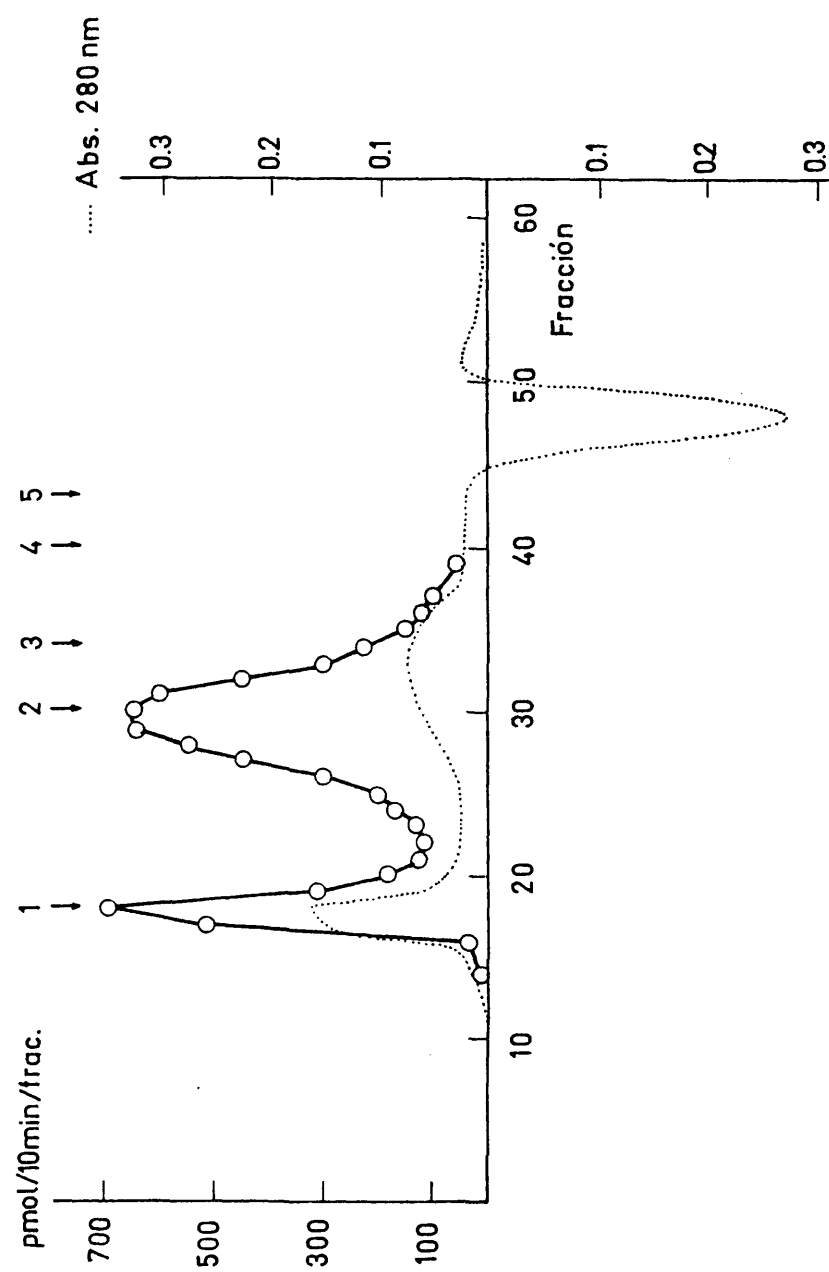


FIGURA 71. Determinación del peso molecular de la adenilato ciclasa soluble (37 000 g)

correspondiente a la absorción a 280 nm para que se observe el pico de absorción negativa que se produce debido a que la columna estaba equilibrada con un tampón que contenía 0.01% de Lubrol PX (el Lubrol PX absorbe a 280 nm) pero la muestra que se había cargado no poseía Lubrol PX, ya que éste se había eliminado por el tratamiento con Bio-Beads SM-2. Esto indicaría que el Lubrol residual después del tratamiento era inferior al 0.01%. Según esto se podría pensar en eliminar el detergente del tampón de equilibrio, pero se ha visto que si se hace se recupera mucha menos actividad de la columna.

El pico que aparece en el volumen de exclusión en la cromatografía anterior desaparece cuando se cromatografía una fracción soluble que procede de una ultracentrifugación a 105 000 g seguida de una cromatografía en DEAE-celulosa en gradiente discontinuo de NaCl, tomando el pico que aparece a 0.1 M de NaCl. Esto se observa en la fig. 72.

TABLA 46: Correspondencia para los picos del ultrogel Aca 22

<u>PICO</u>	<u>PROTEINA</u>
1	AZUL DEXTRANO + AGREGADOS DE 2 Y 3
2	TIROGLOBULINA
3	GLUTAMATO DESHIDROGENASA
4	CATALASA
5	α -AMILASA

El peso molecular aparente que se obtiene en ambos casos para la enzima no agregada es equivalente al de la tiroglobulina de tiroides bovino de 669 000 D con un radio de 81.4 Å.

Este resultado es parecido al obtenido por otros inves

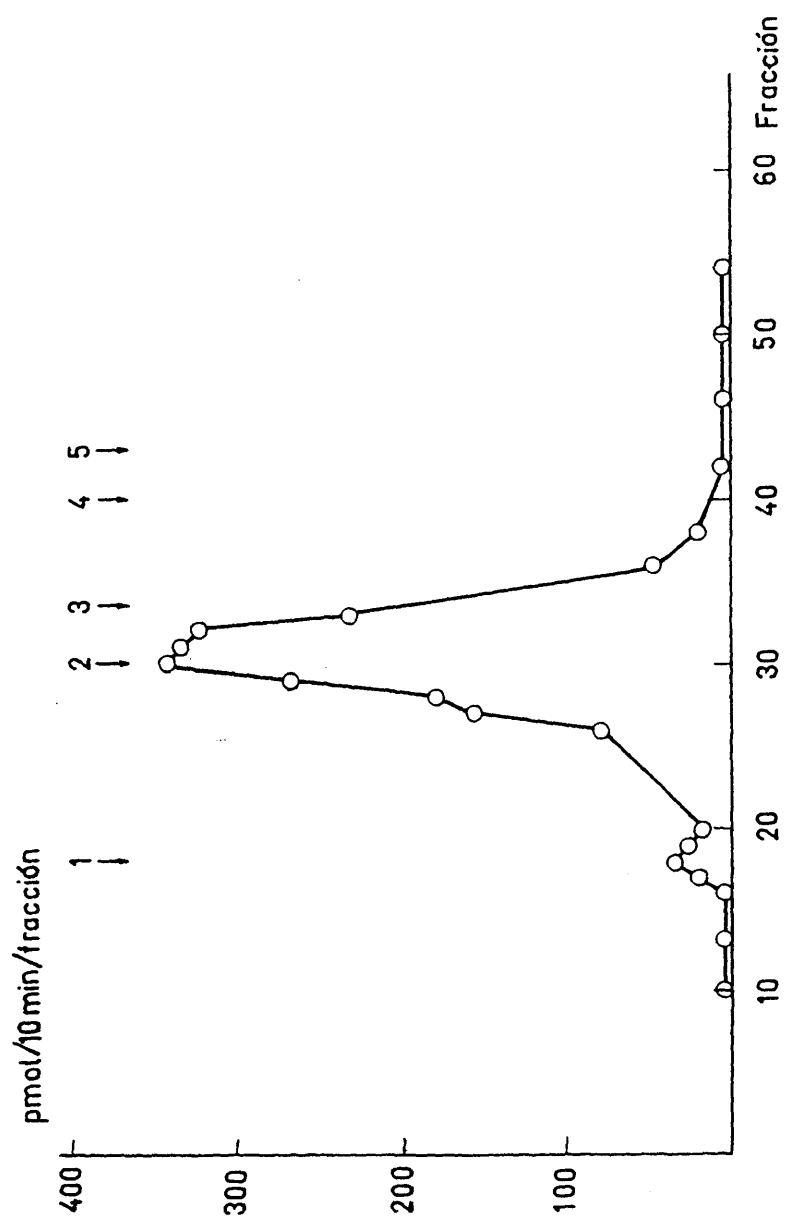


FIGURA 72. Determinación del peso molecular de la adenilato ciclasa soluble (pico DEAE-celulosa NaCl 0.1 M)

tigadores en otros tejidos (tabla 47), aunque por supuesto, es posible encontrar también otros datos con pesos moleculares inferiores (57, 334). De esto se deduce que la enzima, posiblemente, en función del método de solubilización y del sistema de elución, puede presentar diferentes grados de agregación consigo misma, con el detergente, con otras moléculas del sistema adenilato ciclasa (Receptor, componente regulador) o incluso con otras proteínas y lípidos de la membrana. Esto último no es muy factible, ya que en ese caso los resultados serían difícilmente reproducibles.

TABLA 47: Adenilato ciclasas solubles con pesos moleculares calculados del orden de 5×10^5 D o superiores.

<u>TEJIDO</u>	<u>DETERGENTE</u>	<u>CROMATOGRAFIA</u>	<u>PESO MOLECULAR</u>	<u>REF.</u>
HIGADO (RATA)	LUBROL PX	Aca 22	670 000 D	481
ADRENAL (BOVINO)	LUBROL PX	SEPHAROSA 6B	1 000 000 D	174
ERITROCITO (RANA)	DIGITONINA	SEPHAROSA 6B	670 000 D	485
S. CEREVISIAE	LUBROL PX	SEPHAROSA 6B	450 000 D	25
CEREBRO (RATA)	LUBROL PX	BIOGEL A-15m	800 000 D	478
RIÑON (CERDO)	LUBROL PX	SEPHADEX G-200	800 000 D	163

3.4.2.10. DESACTIVACION TERMICA

Con objeto de estudiar la causa del comportamiento cinético no lineal de la actividad de la enzima en función del tiempo se ha llevado a cabo un serie de trabajos encaminados a determinar en que medida la desactivación térmica de la enzima podía provocar una pérdida de actividad.

En la fig. 73, se puede observar el efecto que sobre la actividad produce la preincubación de la enzima a 37°C a diferen-

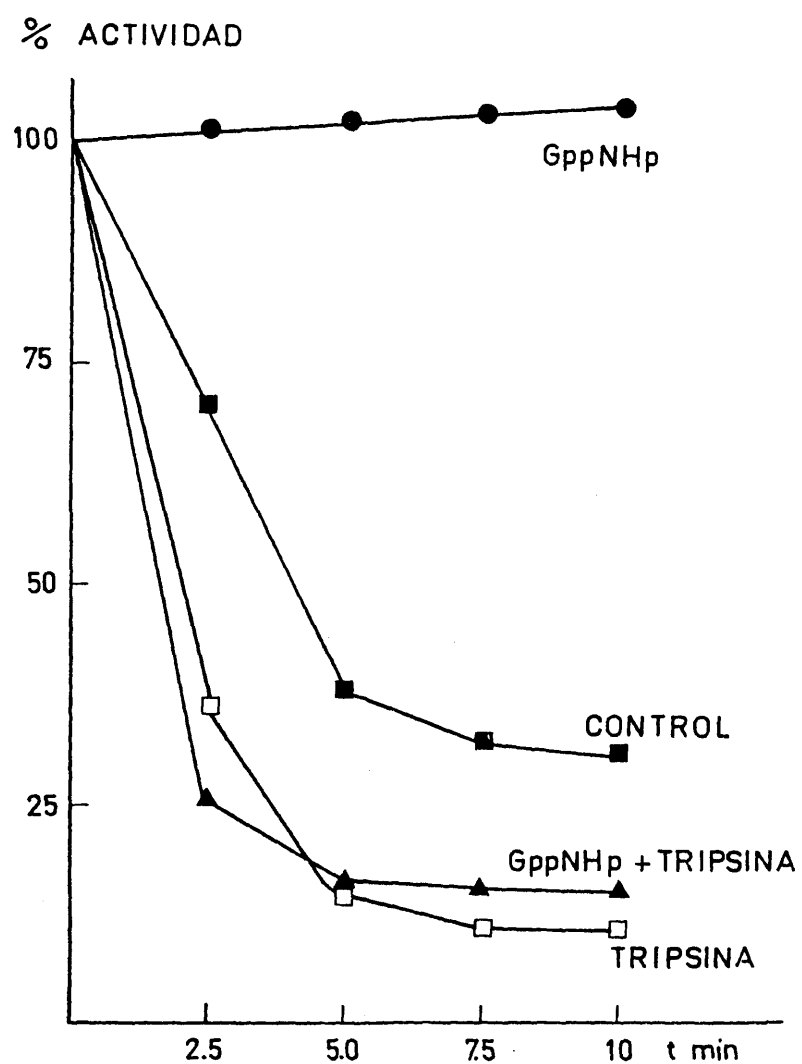


FIGURA 73. Efecto de la preincubación a 37°C a diferentes tiempos sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de $MgCl_2$, con o sin tripsina y con o sin GppNHp.

tes tiempos en presencia de GppNHp y $MgCl_2$. El ensayo control consistía en la enzima preincubada en presencia de $MgCl_2$. Los resultados indican que en tanto que en el control se pierde actividad de forma exponencial, en la preincubación con GppNHp no se pierde la actividad e incluso se aumenta ligeramente, a causa probablemente de la unión de más GppNHp al componente regulador. Para asegurarse de que el efecto protector del GppNHp no era debido a que se bloqueaba el efecto de alguna proteasa intrínseca al sistema, se añadió tripsina ($1 \mu g$) al medio de preincubación. En la misma figura se observa que en presencia de tripsina el GppNHp no puede ejercer su efecto protector, lo que indicaría que la desactivación inicialmente observada responde exclusivamente a un fenómeno térmico.

A continuación se comprobó el efecto de diferentes temperaturas sobre la actividad, preincubando 10 min a cada temperatura en presencia de $MgCl_2$. Los resultados se ofrecen en la fig. 74. Se observa un efecto lineal de la temperatura muy similar al que describen Asbury y col (348) para la enzima particulada de tiroides bovino.

En la tabla 48, se describe el efecto de la preincubación de la enzima durante 10 min a $37^\circ C$ en presencia de diferentes cofactores, ensayándose a continuación la actividad durante 5 min a $37^\circ C$, también en distintas condiciones. De la observación detallada de la tabla se puede concluir:

- 1º. La enzima se desactiva más en presencia de Mg^{2+} que de Mn^{2+} lo que puede indicar la mayor actividad obtenida en presencia de este último; sin embargo, la ausencia de ATP durante la preincubación aboga a favor de una independencia en la acción del catión, establecida posiblemente a través de su propio sitio de unión.

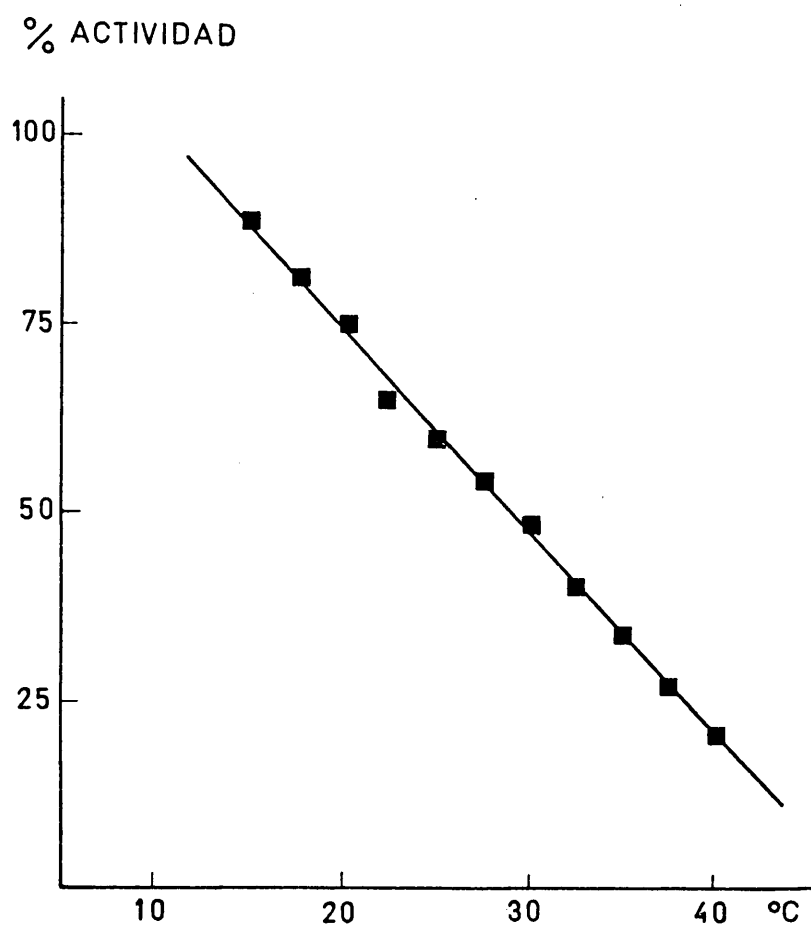


FIGURA 74. Efecto de la preincubación a diferentes temperaturas (10 min) sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de $MgCl_2$.

TABLA 48: Efecto de la desactivación térmica en la adenilato ciclasa de cabeza de *Ceratitis capitata*. La preincubación se realiza a 37°C durante 10 min en presencia de diferentes cofactores. La incubación se realiza a 37°C durante 5 min también en presencia de distintos cofactores. Los datos se expresan en porcentajes sobre el control como $\bar{x} \pm \sigma_{n-1}(n)$, donde \bar{x} es el valor medio, σ_{n-1} la desviación estándar y n el número de experimentos, habiéndose realizado éstos por duplicado.

INCUBACION	MgCl_2		MnCl_2		MgCl_2		MnCl_2		MgCl_2		MnCl_2	
	PREINCUBACION	MgCl_2	MnCl_2	NaF	MgCl_2	NaF	MnCl_2	NaF	GppNHP	GppNHP	GppNHP	GppNHP
Sin preincubar	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Sin cofactores	$49 \pm 13(2)$	$73 \pm 7(2)$	$77 \pm 2(2)$	$76 \pm 3(2)$	$78 \pm 3(2)$	$79 \pm 2(2)$	$73 \pm 6(2)$					
MgCl_2	$25 \pm 7(2)$	-	$30 \pm 5(3)$	-	$20 \pm 3(2)$	-	$31 \pm 2(2)$					
MnCl_2	-	$52 \pm 4(4)$	-	$43 \pm 8(3)$	-	$39 \pm 4(2)$	-					
GppNHP	-	-	-	-	$126 \pm 4(3)$	$103 \pm 7(2)$	$114 \pm 14(2)$					
NaF	-	-	$72 \pm 8(3)$	$70 \pm 8(2)$	-	-	$76 \pm 5(2)$					
$\text{MgCl}_2 + \text{GppNHP}$	-	-	-	-	$107 \pm 14(3)$	-	$53 \pm 2(2)$					
$\text{MnCl}_2 + \text{GppNHP}$	-	-	-	-	-	$69 \pm 3(2)$	-					
$\text{MgCl}_2 + \text{NaF}$	-	-	$76 \pm 9(3)$	-	-	-	$67 \pm 5(2)$					
$\text{MnCl}_2 + \text{NaF}$	-	-	-	$76 \pm 5(2)$	-	-	-					
NaF + GppNHP	-	-	-	-	-	-	$98 \pm 13(2)$					

- 2º. En ausencia de metales la desactivación es mucho menor que en su presencia.
- 3º. El GppNHp en ausencia de cationes protege la enzima de forma absoluta e incluso se mejora algo su actividad con la preincubación.
- 4º. El GppNHp en presencia de Mg^{2+} protege la activación por GppNHp pero no por fluoruro. Esto último no tiene una explicación sencilla, pero, a priori, se puede pensar en dos hipótesis; una es que conocido el efecto inhibitor del GppNHp sobre la activación del fluoruro (fig.56), podría suceder que el GppNHp en presencia del Mg^{2+} bloquease en la preincubación de forma irreversible la activación por fluoruro. Otra posibilidad es que conocido el efecto negativo que el Mg^{2+} tiene sobre la estabilidad de la enzima, el GppNHp en su presencia sólo pudiese proteger su sitio dejando sin protección otro posible sitio para el fluoruro, lo que nos llevaría por lo tanto a postular sitios de unión diferentes para ambos.
- 5º. El GppNHp en presencia de Mn^{2+} protege mucho menos la enzima frente a la activación por GppNHp que lo que lo hace en su ausencia o en presencia de Mg^{2+} . Esto explicaría por qué el GppNHp no activa apenas la enzima en presencia de Mn^{2+} .
- 6º. El fluoruro protege por igual la enzima en presencia de Mg^{2+} Mn^{2+} o en ausencia de ambos en todas las circunstancias. Pero su efecto protector no llega a superar nunca el 75%.

Todo ello indica que en presencia de GppNHp y fluoruro se producen una serie de cambios conformacionales que son capaces de proteger total o parcialmente la enzima frente a una desnaturalización térmica.

El hecho de que el GppNHp pueda proteger la enzima en ausencia de metal indicaría que la unión -como se ha postulado- se puede hacer sin colaboración del metal, el cual podría inclu-

so perjudicar esta unión, como se ve en el caso del Mn^{2+} .

El hecho de que en presencia de metales la desactivación sea más fuerte indicaría que existe algún tipo de interacción entre éstos y la enzima, en ausencia de sustrato, lo que su pondría un apoyo firme a la teoría de la existencia de un sitio de unión para los metales, distintos del centro activo.

También puede deducirse que el mecanismo de activación del Fluoruro y del GppNHp es muy diferente, ya que aunque el fluoruro produce una mayor activación no protege la enzima de una forma tan contundente como lo hace el GppNHp. Lo que es difícil obtener de estos datos es una prueba concluyente de si ambos sitios de acción son idénticos o distintos y en este caso si están o no situados sobre el mismo componente.

Por otra parte las pruebas que se han hecho con GTP indican que éste en presencia de Mg^{2+} no protege la enzima frente a la desactivación térmica más que en un 50%, lo que se explicaría porque su potencia como activador es menor que la del GppNHp.

Lo que se explica claramente con estos datos es por qué el comportamiento cinético de la enzima frente al tiempo es de tipo hiperbólico en los estados menos activados, aún en presencia de sistemas regeneradores de ATP. Es evidente que la enzima pierde actividad a medida que la incubación transcurre y por lo tanto la velocidad disminuye. Por eso en presencia de fluoruro la cinética es casi lineal porque no se desactiva apenas la enzima.

3.4.2.11. TRATAMIENTO CON TRIPSINA

En la fig. 73 se aprecia el efecto que ejerce la tripsina sobre la actividad enzimática. Parece deducirse de ello que la enzima está muy expuesta al medio externo, ya que es fácilmente accesible a la tripsina. Pero en esta figura se observa ade-

más otro hecho importante y es que aproximadamente la pérdida de actividad enzimática es independiente de la presencia o ausencia de GppNHp, lo que implica por una parte, que la conformación que toma la enzima en presencia de GppNHp no es lo suficientemente estable para que se proteja frente a la tripsina. Pero, por otra parte, el hecho de que no disminuya la activación relativa por GppNHp con respecto al control indicaría que el componente que une el GppNHp no es atacado por la tripsina, ya que de ser así se tendría que observar una doble pérdida de actividad, por un lado por pérdida del componente catalítico y por otra del componente regulador, ya que la actuación de la tripsina sería independiente, Cabría la posibilidad de que la tripsina sólo pudiese acceder al componente regulador una vez eliminado el componente catalítico pero en cualquier caso lo que esto indicaría es que ese componente regulador se encuentra fuertemente protegido.

En la fig. 75 se representa el efecto de la tripsina frente a la activación por GppNHp y NaF cuando se encuentran ausentes (A) o presentes (B) en la preincubación que se hace con tripsina 0.1 μ g durante 10 min a 20°C, según se explica en el apartado de métodos. La diferencia entre A, B y el control es que este último se incuba sólo con $MgCl_2$ 10 mM, en tanto que en los otros se hace con $MgCl_2$ 10 mM más GppNHp 0.1 mM, $MgCl_2$ 10 mM y NaF 10 mM.

Lo más significativo de estos resultados es que la desactivación provocada sobre la enzima no parece afectar al componente regulador como antes se discutió, pero además es independiente de que tal activador se encuentre presente o no en dicha preincubación. Se aprecia una ligera protección por parte tanto del GppNHp como del NaF en el caso B, así como una ligera pérdida de activación por NaF tanto en A como en B, pérdida que

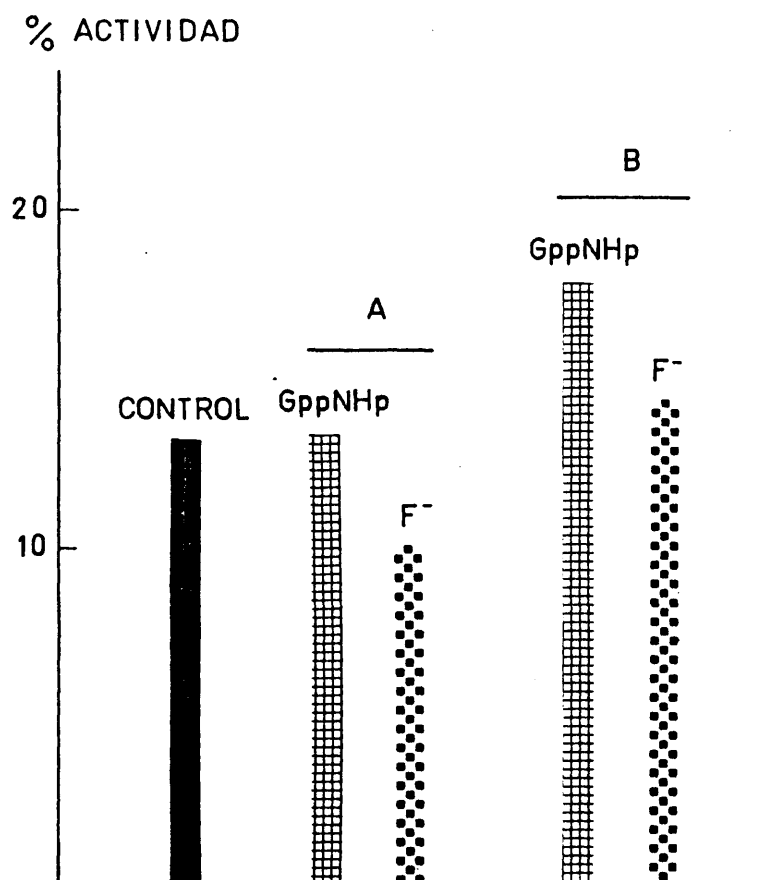


FIGURA 75. Efecto de la tripsina sobre la actividad de adenilato ciclasa, preincubando en presencia de MgCl_2 sin GppNHp o NaF (A) o con GppNHp o NaF (B).

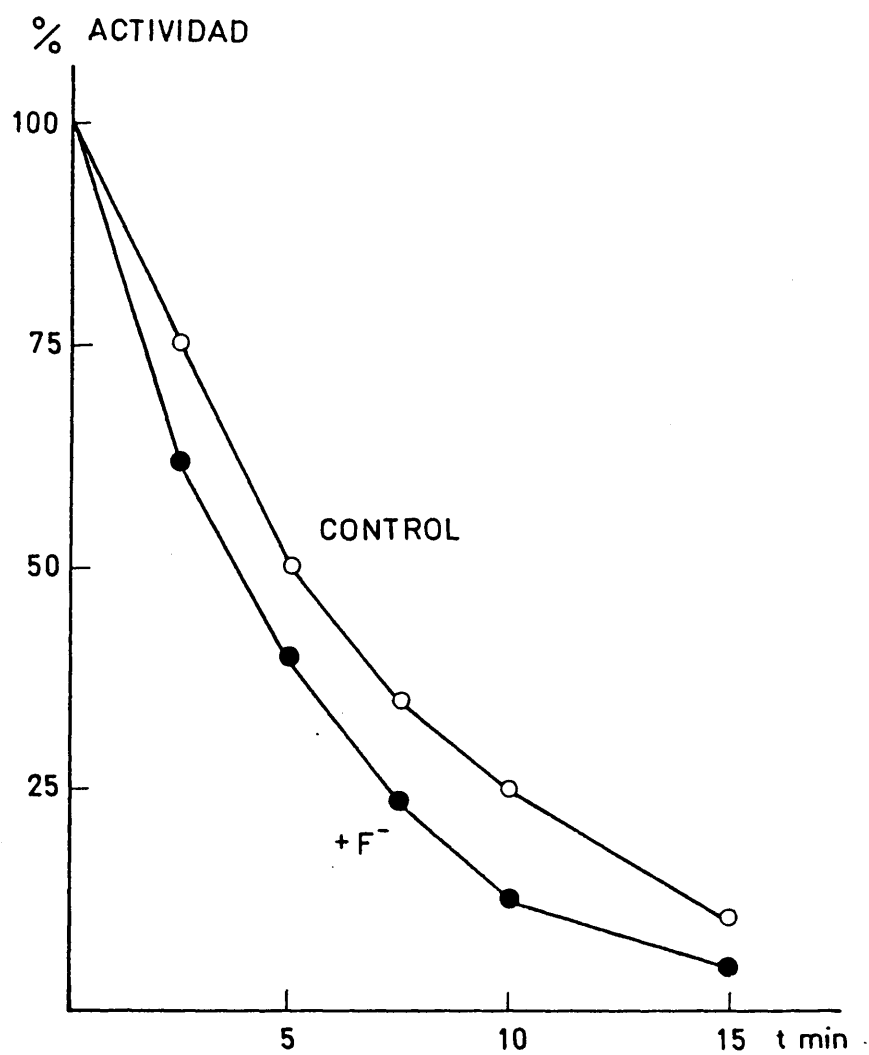


FIGURA 76. Efecto de la tripsina sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de MgCl_2 , ensayada con o sin NaF 10 mM.

también se aprecia en la fig. 76 donde se compara la pérdida de actividad que sufre la enzima después de haber sido tratada a diferentes tiempos, ensayada con MgCl_2 10 mM y con MgCl_2 10 mM más NaF 10 mM.

Esto de ser significativo, podría indicar que el sitio de unión para ambos no es equivalente, ya que presentaría distinta accesibilidad a la tripsina. Aunque también podría ser interpretado en el sentido de que al estar mucho más activa la enzima en presencia de NaF las pequeñas pérdidas del componente regulador que se puedan producir se observarían con una mayor amplificación.

3.4.2.12. TRATAMIENTO CON FOSFOLIPASA A_2

Lo primero que se observa cuando se somete una preparación de membranas a la acción de la fosfolipasa A_2 es una pérdida progresiva de actividad a medida que la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana transcurre. De esto se deduce evidentemente que la pérdida de la estructura lipídica de la membrana redonda en perjuicio de la actividad de la adenilato ciclasa.

A raíz de estos resultados primarios se intentó estudiar como afectaba la fosfolipasa a los diferentes componentes del sistema y para ello lo que se hizo fue preincubar la fracción particulada que contiene la adenilato ciclasa con fosfolipasa A_2 y después observar cual es el tanto por ciento de desactivación relativa en presencia de los diferentes activadores. En la tabla 49 y la fig 77 se puede ver el resultado de algunos experimentos. Antes de comentar los resultados hay que hacer constar que resulta imposible obtener en diferentes experimentos las mismas desactivaciones porcentuales, ya que se utilizan distintas preparaciones de membrana y además trabajando con tan pequeñas cantidades de fosfolipasa 0.1 μg una mínima variación en algún

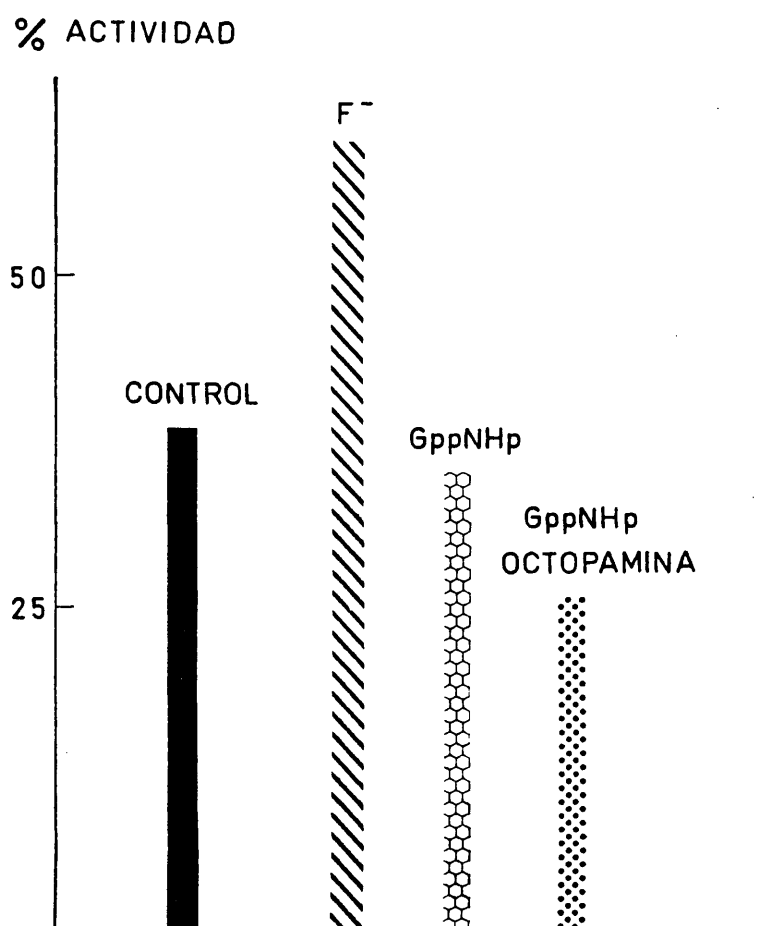


FIGURA 77. Efecto de la fosfolipasa A₂ sobre la actividad de adenilato ciclasa en presencia de diferentes moduladores.

factor como tiempo de preparación de la enzima, variación de la temperatura ambiente y otros pequeños detalles del método experimental hacen que los datos sólo puedan ser comparados en valor absoluto dentro del mismo experimento, debiéndose comparar los experimentos distintos sólo de forma cualitativa.

TABLA 49: Efecto de la Fosfolipasa A_2 sobre la actividad de la adenilato ciclasa. Los resultados se expresan como % de actividad con respecto a los controles en ausencia de actividad fosfolipásica.

ADICION	EXP. 1 (10 min)	EXP. 2 (10 min)	EXP. 3 (15 min)	EXP. 4 (5 min)
MgCl ₂ 10 mM	18	7	39	85
MgCl ₂ 10 mM + GppNHp 0.1 mM	16	-	35	81
MgCl ₂ 10 mM + GppNHp 0.1 mM + Octopamina 1 mM	9	-	26	40
MgCl ₂ 10 mM + NaF 10 mM	-	17	58	88

De todos los datos expuestos se desprende un hecho altamente significativo, la activación por octopamina es la actividad que más sufre en el tratamiento. Este hecho coincide con los resultados de Rodbell y col (237) el cual en membranas de hepatocitos demuestra que el tratamiento con fosfolipasa A_2 afecta fundamentalmente a la activación de la adenilato ciclasa por GTP + Glucagón. El mismo efecto se observó con la fosfolipasa C (236). Sin embargo, en estos resultados no se modifican apenas los efectos del fluoruro y del GppNHp. Esto sería cierto en el caso que aquí nos ocupa, si tomáramos como referencia los datos del experimento número 4 de la tabla 49. Ahora bien, cuando la desactiva

ción es más fuerte lo que se observa es que la activación por fluoruro se ve mucho menos afectada que la actividad basal o la activación por GppNHp. El significado de estos hechos es aún oscuro, pero podría tener una fácil explicación si se piensa que el fluoruro, como de sobra es conocido, no actúa "in vivo" porque se supone que en ese caso la estructura de la membrana le impide el acceso al centro de acción, según esto sería de esperar que a medida que esta estructura se deteriorase el fluoruro tendría una mayor accesibilidad a dicho centro y por lo tanto su efecto se vería incrementado. Se sumarían así dos efectos, por una parte la desactivación de la actividad catalítica y por otra el aumento de la activación por fluoruro, lo que daría como resultado una menor pérdida de actividad cuando se ensaya la adenilato ciclasa en presencia de fluoruro. Un dato más que podría apoyar esta hipótesis es que en un experimento en el que se trató la preparación de adenilato ciclasa con fosfolipasa A_2 pero con un tiempo de reacción muy corto, se pudo observar que en tanto que la actividad basal no sufría ninguna variación apreciable la activación por fluoruro aumentaba hasta un 117%.

Dentro de este capítulo se han realizado también una serie de experimentos en búsqueda de la reconstitución del sistema después de haber tratado las preparaciones con fosfolipasa A_2 . Para ello después de desactivar parcialmente las preparaciones de membrana con fosfolipasa A_2 se investigó el efecto que sobre la actividad tendría la adición de diferentes cantidades de fosfolípidos totales extraídos del insecto adulto de Ceratitis capitata. Los resultados pueden verse en las figs. 78 y 79. Se observa claramente una recuperación de la actividad en ambos casos cuando se añaden los fosfolípidos al medio de incubación. Sólo existe en la bibliografía un dato similar a éste presentado por Rodbell y col (232). Estos investigadores estudiaron el

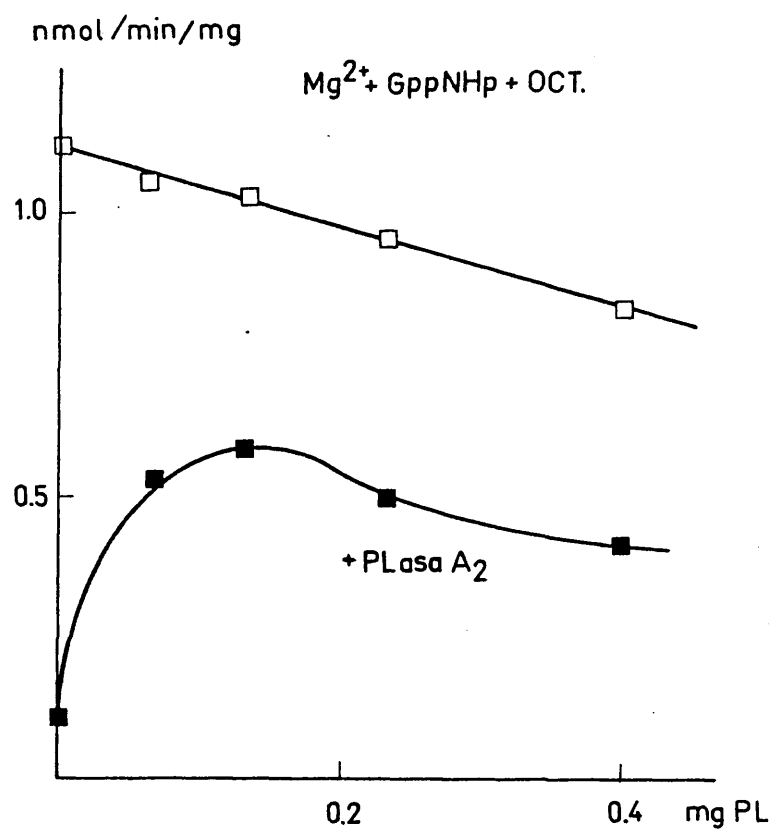


FIGURA 78. Efecto de la adición de fosfolípidos totales de membranas de *Ceratititis capitata* sobre la actividad de adenilato ciclasa antes y después del tratamiento de la enzima con fosfolipasa A₂. La actividad se expresa en nmol cAMP/min/mg proteína.

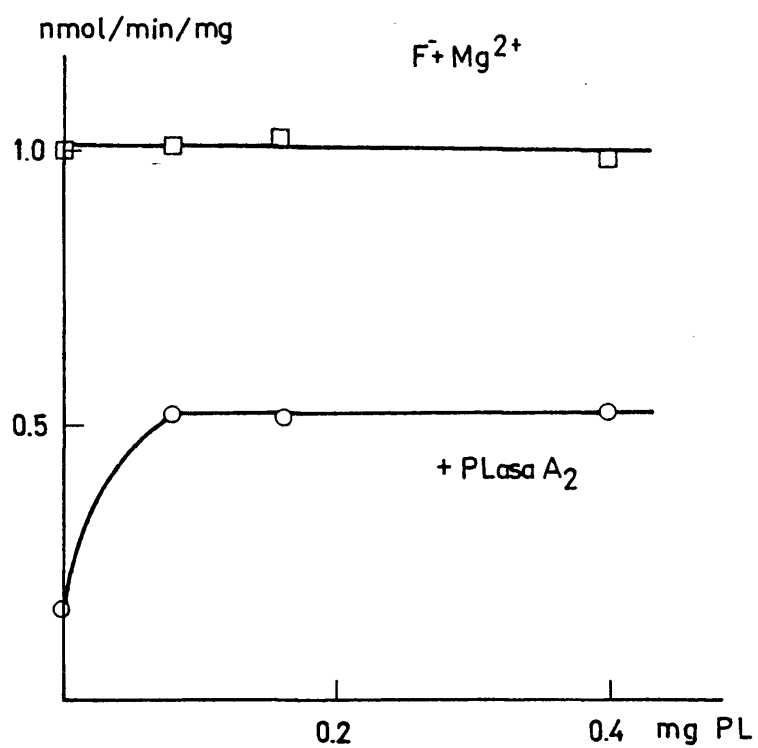


FIGURA 79. Efecto de la adición de fosfolípidos totales de membranas de *Ceratitis capitata* sobre la actividad de adenilato ciclas antes y después del tratamiento de la enzima con fosfolipasa A_2 . La actividad se expresa en nmol cAMP/min/mg proteína.

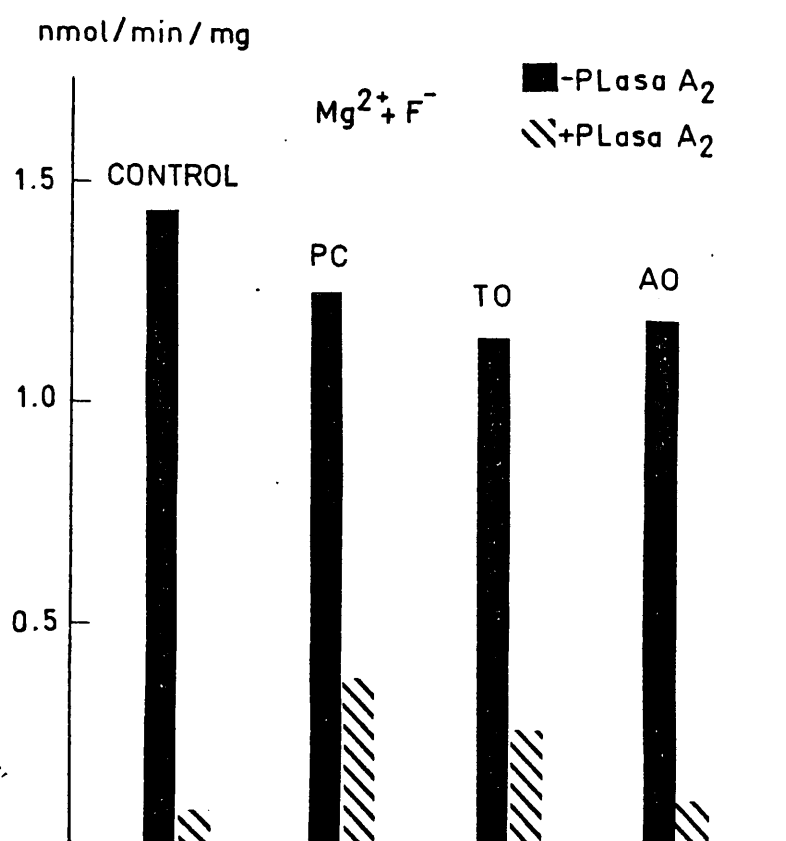


FIGURA 80. Efecto de la adición (100 μ g) de diferentes lípidos sobre la actividad de adenilato ciclasa antes y después del tratamiento de la enzima con Fosfolipasa A₂. La actividad se expresa en nmol cAMP/min/mg proteína.

efecto de la digitonina y la fosfolipasa A_2 sobre la adenilato ciclasa de membranas de hepatocito de rata. Vieron que el efecto de la desactivación de ambos agentes sobre la actividad de la adenilato ciclasa era revertido parcialmente por la adición de un preparado de lípidos extraídos de la membrana.

Se intentó comprobar a continuación si el efecto de los fosfolípidos era específico o podía ser mimetizado por otros lípidos. En la fig. 80 se muestra el efecto que tienen sobre la actividad enzimática ensayada con $MgCl_2$ 10 mM y NaF 10 mM la adición de 100 μg de fosfatidilcolina (PC), trioleína (TO) y ácido oléico (AO) después de haber tratado la fracción particulada con fosfolipasa A_2 . Se observa claramente un aumento de actividad en los tres casos con respecto a los controles tratados con fosfolipasa. Este aumento es mayor en presencia de fosfatidilcolina pero no es exclusivo, lo que indicaría que el efecto de estos lípidos se debe no a una reconstitución de la membrana, que no puede suceder con la trioleína, sino más bien, a una protección de la estructura hidrofóbica del sistema que habría quedado expuesto al medio como consecuencia de la desestructuración de las membranas. Los lípidos mimetizarían el entorno de la membrana o al menos mitigarían el efecto del medio hidrofílico sobre la enzima.

3.4.2.13. ESTUDIO DEL EFECTO DE UN INHIBIDOR ENDOGENO

El descubrimiento de un inhibidor endógeno para la adenilato ciclasa surgió de los estudios realizados en colaboración con A. Haro (489) sobre un inhibidor endógeno de una de las proteínas quinasas dependientes de cAMP de Geratitis capitata. Cuando se estudiaba el posible efecto inhibidor de la proteína receptora de cAMP sobre la proteína quinasa del insecto, se observó que tal efecto era debido a otra sustancia contaminante presente en la preparación derivada del Biogel-HTP. Esta sustancia no po

seía actividad de proteína-fosfatasa y como se comprobó más tarde poseía un peso molecular muy pequeño del orden de 1 000 D, por lo que se podía separar fácilmente de la proteína receptora de cAMP por cromatografía de penetrabilidad. Entre las características estructurales que hasta ahora son conocidas de esta molécula y que constituyen una parte del trabajo de tesis doctoral de A. Haro destacan:

- 1º. Termoestable a 100°C durante 20 min
- 2º. Resistente a tripsina y pronasa
- 3º. Peso molecular 1 000 D
- 4º. Presenta un anillo de purina (posiblemente de adenina) con máximo de absorción a 257 nm y un mínimo a 230 nm.
- 5º. Presenta aminoácidos como constituyentes de su molécula (glutámico, glicocola, serina y aspártico) El N-terminal está bloqueado.
- 6º. Cromatografía en electroforesis y en TLC con un Rf muy similar al del AMP.

El inhibidor que en principio se ensayó con proteína quinasa fue probado con la adenilato ciclasa. Su efecto se puede ver en la tabla 50. El inhibidor que aquí se ensayó había sido purificado de cabeza de insecto adulto por centrifugación del homogeneizado a 37 000 g calentamiento a ebullición durante 20 min, cromatografía en Sephadex G-25 y G-50, Biogel HTP y cromatografía con celulosa en capa fina.

El efecto inhibidor se manifiesta tanto sobre la fracción particulada como la soluble, lo cual es muy interesante en vistas a determinar su mecanismo de actuación, ya que recuerda éste al de la adenosina. El efecto inhibidor de esta sustancia (o sustancias) se ha ensayado en el material procedente de los

distintos estadios del desarrollo del insecto. Para ello después de homogeneizar, en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7.0 con 2-mercáptoetanol 7 mM (1/2 p/v), los distintos lotes de individuos, se sometió el homogeneizado a calentamiento a ebullición durante 10 min y el resultado se centrifugó, extrayéndose el sobrenadante, a continuación se determinó el efecto de una alícuota de 25 μ l de este preparado sobre la adenilato ciclasa de fracción particulada de cabeza de adulto, ensayada en presencia de $MgCl_2$ 10 mM y NaF 10 mM. El control se ensayó en presencia de una alícuota de 25 μ l que sólo contenía tampón de homogeneización. Los resultados pueden verse en la tabla 51. Según estos datos la mayor actividad inhibidora se da en el huevo y en el adulto, apareciendo muy pequeñas cantidades en el adulto farato.

TABLA 50: Efecto del inhibidor endógeno sobre la actividad de la adenilato ciclasa.

	<u>-INHIBIDOR</u>	<u>+INHIBIDOR</u> (50 μ l)
ADENILATO CICLASA DE FRACCION PARTICULADA		
MgCl ₂ 10 mM + MnCl ₂ 1 mM + NaF 10 mM (pmol cAMP/min/mg de proteína)	1 535	693
ADENILATO CICLASA SOLUBLE		
Pico 0.1 M NaCl DEAE-celulosa		
MnCl ₂ 1 mM (pmol cAMP/10 min/25 μ l)	67	41

La potencialidad reguladora de este tipo de sustancias ha de jugar un papel decisivo en las actividades enzimáticas "in

vivo", sin dejar de tener presente la posible influencia, más o menos accidental, sobre las determinaciones "in vitro".

TABLA 51: Presencia del inhibidor endógeno a lo largo del desarrollo del díptero Ceratitis capitata. La actividad inhibidora se ensayó sobre la adenilato ciclasa de fracción particulada en presencia de $MgCl_2$ 10 mM y NaF 10 mM. Se toma una alícuota de 25 μ l del inhibidor presente en el sobrenadante de 37 000 g después de calentar el homogeneizado a ebullición 10 min.

<u>ESTADIO</u>	<u>%INHIBICION (25 μl)</u>	<u>mg proteína/25 μl</u>
CONTROL	0	-
HUEVO	57	0.063
LARVA 3 DIAS	33	0.165
LARVA 5 DIAS	29	0.115
LARVA 7 DIAS	35	0.144
APOLISIS	22	0.213
ADULTO FARATO 3 DIAS	9	0.269
ADULTO FARATO 5 DIAS	9	0.378
ADULTO FARATO 7 DIAS	18	0.350
ADULTO 1 DIA	53	0.195

Por último hay que señalar que sustancias inhibidoras posiblemente relacionadas con ésta han sido descritas en otros sistemas biológicos. Una revisión sobre este particular puede encontrarse en (489).

4.- CONCLUSIONES

El presente trabajo se ha centrado en el estudio de las enzimas que biosintetizan los nucleótidos cíclicos en el díptero Ceratitis capitata, haciendo especial hincapié en la caracterización de la adenilato ciclasa presente en la cabeza del insecto adulto.

La puesta a punto de los métodos radioenzimáticos necesario para la determinación de las actividades de guanilato y adenilato ciclasas, así como de otras enzimas directa o indirectamente implicadas en el metabolismo de los nucleótidos cíclicos, ha constituido una parte esencial de este trabajo. Actualmente se dispone de un método muy sensible y preciso que permite cuantificar los niveles de actividad de las nucleótido-cíclico ciclasas en el orden de pmol de nucleótido cíclico/min/mg de proteína, con un error de $\pm 5\%$.

La actividad de adenilato ciclasa tanto del adulto entero como de la cabeza del adulto, se encuentra asociada a la fracción particulada, no detectándose actividad alguna en la fracción soluble. El proceso de purificación de la fracción particulada mediante centrifugación en gradiente de sacarosa ha permitido obtener una preparación altamente enriquecida en adenilato ciclasa, con la que se han realizado los ensayos enzimáticos que en la memoria se exponen.

La adenilato ciclasa del insecto necesita como cofactor imprescindible para la catálisis, un metal divalente, que puede ser Mn^{2+} , Mg^{2+} o Co^{2+} . El orden de actividad en presencia de estos metales es $Mn^{2+} > Mg^{2+} > Co^{2+}$, siendo las concentraciones óptimas 1 mM, 10 mM y 1 mM respectivamente. Estas concentraciones son muy superiores a las que cabría esperar como necesarias para la formación del complejo que ha de actuar como sustrato, Me^{2+} -ATP, por lo que se postula la presencia de un segundo sitio de unión para

los metales, distinto del centro catalítico.

El Ca^{2+} actúa como un inhibidor de la adenilato ciclasa, siendo mayor la inhibición en presencia de Mg^{2+} que de Mn^{2+} , por lo que se postula que el orden de afinidad por los metales en ese hipotético sitio alostérico de unión, ha de ser $\text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} > \text{Mg}^{2+}$.

El F^- es el activador más potente que se conoce para la adenilato ciclasa, siendo su efecto más marcado en presencia de Mg^{2+} que de Mn^{2+} . La presencia conjunta de ambos metales produce un efecto sinérgico con el F^- , consiguiéndose de esta forma la actividad máxima.

Los aniones MoO_4^{2-} , WO_4^{2-} y VO_3^- son capaces de activar la enzima por un mecanismo posiblemente similar al del F^- . Sin embargo, el molibdato estimula más la adenilato ciclasa en presencia de Mn^{2+} . Tanto el molibdato como el vanadato consiguen la activación máxima a concentraciones inferiores a las que actúa el F^- .

El anión N_3^- incrementa la actividad de la adenilato ciclasa en las preparaciones de adulto farato, pero no tiene efecto en las de cabeza de adulto.

La adenosina a concentraciones del orden de micromolar se comporta como un inhibidor de la adenilato ciclasa, siendo su efecto más marcado en presencia de Mn^{2+} . El porcentaje de inhibición es mayor cuanto más activada esté la enzima. El AMP, ADP y la 2'-desoxiadenosina mimetizan su acción. La inhibición posiblemente se realiza via sitio "P".

El GTP activa la adenilato ciclasa de las preparaciones de cabeza de adulto pero inhibe la enzima en las de adulto farato. La activación se produce exclusivamente en presencia de Mg^{2+} . El GppNHp es mucho más potente como activador que el propio GTP, por

lo que el efecto activador ha de producirse por un mecanismo distinto a la fosforilación. El efecto del GppNHp es mayor en presencia de Co^{2+} o Mg^{2+} que en presencia de Mn^{2+} . El aumento de la concentración de Mg^{2+} en el medio de incubación disminuye la potencia activadora del GTP y GppNHp, por lo que se supone que la unión de ambos nucleótidos a un componente regulador ha de hacerse en ausencia de cationes metálicos.

La octopamina, adrenalina, noradrenalina y tiramina activan la adenilato ciclasa en presencia de GTP sin que se observe efecto alguno de la dopamina, serotonina, feniletilamina e isoproterenol. No se aprecian efectos aditivos entre los distintos activadores por lo que se supone que actúan a través del mismo receptor. En presencia de GppNHp se ha observado un efecto estimulador de la dopamina y serotonina por lo que no se descarta la posibilidad de que aparte de receptores octopaminérgicos puedan encontrarse en el insecto receptores serotoninérgico y dopaminérgicos.

El efecto de la octopamina se bloquea en presencia de fentolamina y en menor medida en presencia de propanolol. La inhibición producida por la ciproheptadina y la clorpromacina no parece ser específica para los receptores octopaminérgicos.

Los estudios de desactivación térmica de la adenilato ciclasa demuestran que la presencia de cationes divalentes en el medio de incubación contribuye a la pérdida de actividad. El GppNHp y en menor medida el F^- ejercen un efecto protector en contra de esta desactivación.

El tratamiento de los preparados de membrana con tripsina conlleva una pérdida de actividad de adenilato ciclasa, lo que indica que el componente catalítico debe estar situado en una posición accesible para la tripsina, en tanto que el compo

nente regulador presenta una considerable resistencia a la hidrólisis triptica.

El tratamiento con fosfolipasa A_2 de los preparados de membrana indica que la estructura lipídica es esencial para la actividad enzimática de la adenilato ciclasa ya que la actividad de ésta se pierde después de la hidrólisis de los fosfolípidos de la membrana. El acoplamiento entre el receptor hormonal y el componente catalítico se pierde, sin que se vea afectado el acoplamiento entre el componente catalítico y el componente regulador.

Del conjunto de datos presentados se deduce que la regulación de la adenilato ciclasa del díptero Ceratitis capitata es en muchos aspectos similar a la de mamíferos, con lo que se establece un nuevo eslabón dentro del desarrollo evolutivo de los mecanismos de regulación de esta enzima.

2. 8/1

5. BIBLIOGRAFIA

- 1.- Sutherland E. W., Rall T. W. (1957) J. Chem. Soc. 79, 3608.
- 2.- Rall T. W., Sutherland E. W. (1958) J. Biol. Chem. 232, 1065-1076.
- 3.- Sutherland E. W., Rall T. W. (1958) J. Biol. Chem. 232, 1077-1091.
- 4.- Sutherland E. W., Rall T. W., Menon T. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1220-1227.
- 5.- Rall T. W., Sutherland E. W. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1228-1232.
- 6.- Murad F., Chi Y. M., Rall T. W., Sutherland E. W. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1233-1238.
- 7.- Klainer L. M., Chi Y. M., Freidberg S. L., Rall T.W., Sutherland E. W. (1962) J. Biol. Chem. 237, 1239-1243.
- 8.- Ashman D.F., Lipton R., Melicow M. M., Price T. D. (1963) Biochem. Biophys. Res. Commun. 11, 330-334.
- 9.- Ishikawa E., Ishikawa S., Davis J. W., Sutherland E. W. (1969) J. Biol. Chem. 244, 6371-6376.
- 10.- Hardman J. G., Sutherland E. W. (1969) J. Biol. Chem. 244, 6363-6370.
- 11.- White A.A., Aubach G. D. (1969) Biochim. Biophys. Acta 191, 686-697.
- 12.- Schultz G., Böhme E., Munske K. (1969) Life Sci. 8, 1323-1332.
- 13.- Steiner A. L., Pagliara A. S., Chate L. R., Kiphis D. M. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1114-1120.
- 14.- Gilman A. G. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67, 305-312.
- 15.- Solomon Y., Londos C., Rodbell M. (1974) Anal. Biochem. 58, 541-548.
- 16.- Bloch A. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 331-338.
- 17.- Cailla H. L., Goridis C., Roux D. R., Reutter W., Delaige M. A. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9, 768.
- 18.- Cech S. Y., Ignarro L. J. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide Res.

- 9, 770-771.
- 19.- Weiss B. (1970) en "Biogenic Amines as Physiological Regulators (J. J. Blum ed.) (Prentice Hall, New Yersey).
- 20.- Chlapowski F. J., Butcher R. W. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 309, 138-148.
- 21.- Zingales B., Carniol C., Abratiansohn P. A., Colli W. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 550, 233-244.
- 22.- Wold W. S. M., Suzuki T. (1973) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 55, 824-830.
- 23.- Larson A. D., Sypherd T. S. (1974) *J. Bacteriol.* 117, 432-438.
- 24.- Torres N. H., Flawia M. M., Terenzi H. T., Tellez-Iñon M. T. (1975) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5, 67-78.
- 25.- Varimo K., Londesborough J. (1976) *Biochem. J.* 159, 363-370.
- 26.- Ide M. (1971) *Arch. Biochem. Biophys.* 144, 262-268.
- 27.- Newton R.P. (1974) *Biochem. Soc. Transac.* 2, 385-387.
- 28.- Srivastava A. K., Azhar S., Krishna Murti C. R. (1974) *FEBS Lett.* 47, 330-332.
- 29.- Brown E. G., Al-Nafafi T., Newton R. P. (1979) *Phytochemistry* 18, 9-14.
- 30.- Granner D., Chose L. R., Aurbach G. D., Tomkins G. M. (1968) *Science* 162, 1018-1020.
- 31.- Ross E. M., Haga T., Howlett A. C., Schwarzmeier J., Schleiger L. S., Gilman A. G. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 53-68.
- 32.- Podbell M. (1964) *J. Biol. Chem.* 239, 375-380.
- 33.- Wolff J., Jones A. B. (1971) *J. Biol. Chem.* 246, 3939-3947.
- 34.- De Robertis E., Arnaiz G.R.D.L., Alberici M., Butcher R. W., Sutherland E. W. (1967) *J. Biol. Chem.* 242, 3487-3496.
- 35.- Braun T., Dods R. F. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 1097-1101.
- 36.- Robinson G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W. (1968) *Ann.*

Rev. Biochem. 37, 149-174.

- 37.- Eritman M. L., Levey G. S., Epstein S. E. (1969) Biochem. Biophys. Res. Commun. 35, 728-733.
- 38.- Soifer D., Hechter O. (1971) Biochim. Biophys. Acta 230, 539-542.
- 39.- Liano S., Lin A. H., Tymoczko J. L. (1971) Biochim. Biophys. Acta 230, 535-538.
- 40.- Hechter O., Bär H. P., Matsuba M., Soifer D. (1969) Life Sci. 8, 935-942.
- 41.- Hollinger M. A., (1970) Life Sci. 9, 533-540.
- 42.- Sulimovici S., Lunenfeld B. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 55, 673-679.
- 43.- Sulimovici S., Bartoov B., Lunenfeld B. (1975) Biochim. Biophys. Acta 377, 454-462.
- 44.- Greengard P., Hayaishi O., Colowick S. P. (1969) Fed. Proc. 28, 467.
- 45.- Hayaishi O., Greengard P., Colowick S. P. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5840-5843.
- 46.- Takai K., Kurashina Y., Suzuki C., Okamoto H., Heki A., Hayaishi O. (1971) J. Biol. Chem. 246, 5843-5845.
- 47.- Khandelwal R. L., Hamilton I. R. (1971) J. Biol. Chem. 246, 3297-3304.
- 48.- Kurashina Y., Takai K., Suzuki C., Okamoto H., Hayaishi O. (1974) J. Biol. Chem. 249, 4824-4828.
- 49.- Takai K., Kurashina Y., Suzuki C., Okamoto H., Hayaishi O. (1974) J. Biol. Chem. 249, 1965-1972.
- 50.- Greengard P., Rudolph S.A., Sturtevant J. M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 4798-4800.
- 51.- Perkins J. P. (1973) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 3, 1-64.
- 52.- Ross E. M., Gilman A. G. (1980) Ann. Rev. Biochem. 49, 533-564.

- 53.- Kempner E. S., Schlegel W. (1979) Anal. Biochem. 92, 2-10.
- 54.- Schlegel W., Kempner E. S., Rodbell M. (1979) J. Biol. Chem. 254, 5168-5176.
- 55.- Stellwagen E., Baker B. (1976) Nature 261, 719-720.
- 56.- Neer E. J. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9, 69-83.
- 57.- Rodbell M. (1980) Nature 284, 17-22.
- 58.- Ross E. M., Gilman A. G. (1977) J. Biol. Chem. 252, 6966-6970.
- 59.- Ross E. M., Howlett A. C., Fergunson K. M., Gilman A. G. (1978) J. Biol. Chem. 253, 6401-6412.
- 60.- Mittal C. K., Murad F. (1977) J. Biol. Chem. 252, 3136-3140.
- 61.- Birnbaumer L., Pohl S. L., Rodbell M. (1969) J. Biol. Chem. 244, 3468-3476.
- 62.- Drummond G. J., Severson D. L., Duncan L. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4166-4173.
- 63.- Da Silveira J.F., Zingales B., Colli W. (1977) Biochim. Biophys. Acta. 481, 722-733.
- 64.- Garbers D. L., Johnson R. A. (1975) J. Biol. Chem. 250, 8449-8456.
- 65.- De Haën C. (1974) J. Biol. Chem. 249, 2756-2762.
- 66.- Rendell M., Solomon Y., Lin M. C., Rodbell M., Berman M. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4235-4260.
- 67.- Rodbell M. (1975) J. Biol. Chem. 250, 5826-5834.
- 68.- Lin M. C., Salomon Y., Rendell M., Rodbell M. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4246-4252.
- 69.- Londos C., Rodbell M. (1975) J. Biol. Chem. 250, 3459-3465.
- 70.- Rodbell M., Lin M. C., Salomon Y., Londos C., Harwood J. P., Martin B. R., Rendell M., Berman M. (1974) Acta Endocrinol. Suppl. 191, 11-37.
- 71.- Jacobs S., Bennett V., Cuatrecasas P. (1976) J. Cyclic Nucleotide Res. 2, 205-223.
- 72.- Alvarez R., Bruno J. J. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

- 74, 92-95.
- 73.- Londos C., Preston M. S. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5957-5961.
- 74.- Wiemer G., Kaiser G., Palm D. (1978) Naunyn Schmiedeberg's Arch. Pharmacol. 303, 145-152.
- 75.- Roy C. (1976) J. Supramol. Struct. 4, 289-303.
- 76.- Williams L. T., Lefkowitz R. J. (1978) J. Biol. Chem. 253, 2984-2989.
- 77.- Narayanan N., Sulakhe P. V. (1977) Molec. Pharmacol. 13, 1003-1047.
- 78.- Howlett A. C., Gilman A. G. (1980) J. Biol. Chem. en prensa.
- 79.- Birnbaumer L. (1973) Biochim. Biophys. Acta 300, 129-158.
- 80.- Steer M. L., Atlas A., Levitzki A. (1975) N. Engl. J. Med. 292, 409-414.
- 81.- Jard S., Bockaert J. (1975) Physiol. Rev. 55, 489-536.
- 82.- Brostrom C. O., Kon C. (1974) Anal. Biochem. 58, 459-468.
- 83.- Bradham L. S., Holt D. A., Samo M. (1970) Biochim. Biophys. Acta 201, 250-260.
- 84.- Von Hungen K., Roberts S. (1973) Nature 242, 58-60.
- 85.- Brostrom C. O., Huang Y. C., Breckenridge B. M., Wolff D. J. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 64-68.
- 86.- Mac Donald I. (1975) Biochim. Biophys. Acta 397, 244-253.
- 87.- Brostrom M. A., Brostrom C. O., Breckenridge B. M., Wolff D. J. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4744-4750.
- 88.- Bradham L. S. (1972) Biochim. Biophys. Acta 276, 434-443.
- 89.- Johnson R. A., Sutherland E. W. (1973) J. Biol. Chem. 248, 5114-5121.
- 90.- Cheung W. Y., Bradham L. S., Lynch T. J., Lin Y. M., Tallant E. A. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 66, 1055-1062.
- 91.- Cheung W. Y., Lynch T. J., Wallace R. W. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9, 233-251.
- 92.- Lynch T. J., Tallant E. A., Cheung W. Y. (1976) Biochem. Bio

- phys. Res. Commun. 68, 618-625.
- 93.- Brostrom C.O., Brostrom M. A., Wolff D. J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5677-5685.
- 94.- Lynch T. J., Tallant E. A., Cheung W. Y. (1977) Arch. Biochem. Biophys. 182, 124-133.
- 95.- Wang J. H., Waisman D. M. (1979) Curr. Top. Cell. Regult. 15, 47-107.
- 96.- Brostrom M. A., Brostrom C. O., Breckenridge B. M., Wolff D. J. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9, 85-99.
- 97.- Wang J. H., Desai R. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 926-932.
- 98.- Wang J. H., Desai R. (1977) J. Biol. Chem. 252, 4175-4184.
- 99.- Hirata J. M., Hayaishi O. (1967) Biochim. Biophys. Acta 149, 1-11.
- 100.- Schwenk L. Dept. Physiol. Chem. University of Würzburg (experimentos no publicados) (recogido en Curr. Top. Cell. Regult. 10, 41-87).
- 101.- Flawia M. M., Torres H. n. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6873-6879.
- 102.- Flawia M. M., Torres H. N. (1972) J. Biol. Chem. 247, 6880-6883.
- 103.- Robinson G. A., Butcher R. W., Sutherland E. W. (1971) en "Cyclic AMP" (Academic Press, New York).
- 104.- Pfeuffer T., Helmreich E.J.M. (1975) J. Biol. Chem. 250, 867-876.
- 105.- Sillen L.G., Martell A. E. Eds. (1964) en "Stability Constants of Metal Ion Complexes" 287 (The Chemical Society, Burlington House, London).
- 106.- Warburg O., Christian W. (1941) Biochemische Zeitschrift 310, 384-410.
- 107.- Robinson G. A., Sutherland E. W. (1971) Ann. N. Y. Acad. Sci.

- 185, 5-9.
- 108.- Helmreich E.J.M., Zenner H., Pfeuffer T., Cori C. F. (1976)
Curr. Top. Cell. Regulat. 10, 41-87.
- 109.- Schmidt J. J., Najjar V. A. (1978) Biochim. Biophys. Acta
526, 276-288.
- 110.- Birnbaumer L., Pohl S. L., Krans M.L., Rodbell M. (1970) Adv.
Biochem. Psychopharmacol. 3, 185-208.
- 111.- Drummond G. I., Duncan L. (1970) J. Biol. Chem. 245, 976-983.
- 112.- Rosen O. M., Rosen S. M. (1969) Arch. Biochem. Biophys. 131,
449-456.
- 113.- Birnbaumer L., Pohl S. L., Rodbell M. (1971) J. Biol. Chem.
246, 1857-1860.
- 114.- Hynie S., Sharp G.W.G. (1971) Biochim. Biophys. Acta 230,
40-51.
- 115.- Harwood J. P., Rodbell M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 4901-
4904.
- 116.- Wiseman A. (1970) en "Handbook of Experimental Pharmacology"
(Smith ed.) Pharmacology of Fluorides (Springer Verlag, New
York).
- 117.- Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L. (1970) J. Biol. Chem.
245, 718-722.
- 118.- Bradham L. S. (1977) J. Cyclic Nucleotide Res. 3, 119-128.
- 119.- Hebdon M., Le Vine H. III, Sahyoun N., Schmitger C. J., Cuatrecasas P. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 3693-
3697.
- 120.- Sahyoun N., Schmitger C. J., Le Vine H. III, Cuatrecasas P.
(1977) Life Sci. 21, 1857-1864.
- 121.- Eckstein F., Cassel D., Levkovitz H., Lowe M., Selinger Z.
(1979) J. Biol. Chem. 254, 9829-9834.
- 122.- Herman C. A., Zahler W. L., Doak G. A., Campbell B. J. (1976)
Arch. Biochem. Biophys. 177, 622-629.
- 123.- Perkins J. P., Moore M. M. (1971) J. Biol. Chem. 246, 62-68.

- 124.- Cassel D., Pfeuffer T. (1978) Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 75, 2669-2673.
- 125.- Nielsen T. B., Dowus R. W., Spiegel A. M. (1980) Biochem. J. 190, 439-443.
- 126.- Pfeuffer T. (1979) FEBS Lett. 101, 85-89.
- 127.- Kaslow H. R., Farfel Z., Johnson G.L., Bourne H. R. (1979) Molec. Pharmacol. 15, 472-483.
- 128.- Sternweis P. C., Gilman A. G. (1979) J Biol. Chem. 254, 3330-3340.
- 129.- Schwabe U., Puchstein C., Hannemann H., Sochtig E. (1979) Nature 277, 143-145.
- 130.- Krawietz W., Werdan K., Erdmann E. (1979) Biochem. Pharmacol. 28, 2517-2520.
- 131.- Grupp G., Grupp I., Johnson C.L., Wallick E. T., Schwartz A. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 440-447.
- 132.- Richards J. M., Swislocki N. I. (1979) J. Biol. Chem. 254, 6857-6860.
- 133.- Macara I. G. (1980) Trends Biochem. Sci. 5, 92-94.
- 134.- Rodbell M., Krans H.M.J., Pohl S. L., Birnbaumer L. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1872-1876.
- 135.- Rodbell M., Birnbaumer L., Pohl S. L., Krans H.M.J. (1971) J. Biol. Chem. 246, 1877-1882.
- 136.- Cassel D., Selinger Z. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 4155-4159.
- 137.- Cassel D., Ekstein F., Lowe M., Selinger Z. (1979) J. Biol. Chem. 254, 9835-9838.
- 138.- Iyengar R., Birnbaumer L. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A. 76, 3189-3193.
- 139.- Harwood J. P., Low H., Rodbell M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 6239-6245.
- 140.- Rodbell M., Lad P.M., Nielsen T. B., Schlegel W., Cooper D. M. F., Kempner E. S. (1980) Congreso Internacional de la

FEBS, Jerusalén, S2-1, p. 32.

- 141.- Lad P.M., Welton A. F., Rodbell M. (1977) J. Biol. Chem. 252, 5942-5946.
- 142.- Strosberg A. D., Vauquelin G. V., Trautmann O. D., Klutchko C. D., Bottari S., Andre C. (1980) Trends Biochem. Sci. 5, 11-14.
- 143.- Cuatrecasas P. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 79-104.
- 144.- Wolff J., Cook G. H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6897-6903.
- 145.- Lefkowitz R.J., Williams L.T. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9, 1-17.
- 146.- Perkins J. P., Johnson G. L., Harden T, K. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9, 19-32.
- 147.- Terasaki W. L., Brooker G., de Vellis J., English D., Hsu C. Y., Moylan R. D. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9, 33-52.
- 148.- Nathanson J. A. (1977) Physiol. Rev. 57, 157-256.
- 149.- Williams M. (1980) Trends Biochem. Sci. 5, 18-21.
- 150.- Wolff J., Jones A. B. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 65, 454-459.
- 151.- International Titisee Conference (1980) Trends Biochem. Sci. 5, 219-225.
- 152.- Harden T. K., Wolfe B. B., Sporn J. R., Perkins J. P., Molinoff P. B. (1977) Brain Res. 125, 99-108.
- 153.- Harden T. K., Foster S. J., Perkins J. P. (1979) J. Biol. Chem. 254, 4416-4422.
- 154.- Scharmm M. (1976) J. Cyclic Nucleotide Res. 2, 347-358.
- 155.- Intel P. A., Maguire M. E., Gilman A. G., Bourne H. R., Coffino P., Melmon K. L. (1976) Molec. Pharmacol. 12, 1062-1069.
- 156.- Scharmm M. (1979) Proc. Natl Acad. Sci. U.S.A. 76, 1174-1178.
- 157.- Greaves M. F. (1977) Nature 265, 681-683.
- 158.- Aurbach G. D. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 117-132.
- 159.- Lissitzky S., Fayet G., verrier B. (1975) Adv. Cyclic Nucleo-

- tide Res. 5, 133-152.
- 160.- Rodbell M., Lin M. C., Salomon Y., Londos C., Harwood J. P., Martin B. R., Rendell M., Berman M. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 3-30.
- 161.- Jard S., Roy C., Barth T., Rajerison R., Bockaert J. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 31-52.
- 162.- Scharmm M. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 105-116.
- 163.- Queener S. F., Fleming J. W., Bell N. H. (1975) J. Biol. Chem. 250, 7586-7592.
- 164.- Fain J. N., Malbon C.C. (1979) Mol. Cell. Biochem. 25, 143-169.
- 165.- Brodie G. N., Baenziger N. L., Chase L. R., Majerus P. W. (1972) J. Clin. Invest. 51, 81-88.
- 166.- Asbury R. F., Cook G. H., Wolff J. (1978) J. Biol. Chem. 253, 5286-5292.
- 167.- Gangat Y., Vulliemoz Y., Verosky M., Danilo P., Bernstein K., Triner L. (1979) Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 160, 154-159.
- 168.- Hetenyi G., Singhal R. L. (1973) Horm. Metab. Res. 5, 139.
- 169.- Kempen H.J.M., De Pont J.J.H.H.M., Bonting S. L. (1974) Biochim. Biophys. Acta 370, 573-584.
- 170.- Birnbaumer L., Yang P. C. (1974) J. Biol. Chem. 249, 7848-7856.
- 171.- Harrington C. A., Farmer R. W. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 60, 597-604.
- 172.- Thompson W. J., Johnson D. j., Williams R. H. (1976) Biochemistry 15, 1658-1663.
- 173.- Takasu N., Charrier B., Mauchamp J., Lissitzky S. (1978) Eur. J. Biochem. 90, 131-146.
- 174.- Ushijima Y., Finn F. M., Hofmann K. (1977) Bioorganic Chemistry 6, 223-237.
- 175.- Tang L. C., Cotzias G. C. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.

- 75, 1546-1548.
- 176.- De Pont J.J.H.H.M., Luyben D., Bonting S. L. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 584, 33-42.
- 177.- Kather H., Grisan G. S., Vogt B., Simon B. (1977) *Horm. Metb. Res.* 9, 300-304.
- 178.- Lang U., Fanchere J. L., Pelican G. M., Kartaganis G., Schwyzer R. (1976) *FEBS Lett.* 66, 246-249.
- 179.- Abou-Issa H., Reichert L. E. Jr. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 4166-4174.
- 180.- Dafau M. L., Ryan D. W., Baukal A. J., Catt K. J. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 4822-4824.
- 181.- Dafau M. L., Ryan D. W., Baukal A. J., Catt K. J. (1977) *Mol. Cell. Endocrinol.* 6, 253-269.
- 182.- Malbon C. C., Zull J. E. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 1079-1083.
- 183.- Kitamura S., Ishikawa Y., Scosaki K. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 764.
- 184.- Labrie F., Borgeat P., Lemay A., Lemaire S., Barden N., Drowin J., Lemaire I., Jolicoeur P., Belangar A. (1975) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5, 787-801.
- 185.- Parker C. W. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 647-660.
- 186.- Nathanson J. A., Greengard P. (1977) *Scientific American* (ed. Española) 13, 82-93.
- 187.- Nathanson J. A., Greengard P. (1973) *Science* 180, 308-310.
- 188.- Rasmussen H., Jensen P., Lake W., Friedman N., Goodman D. B. P. (1975) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5, 375-394.
- 189.- Lee C. Y. (1978) *Endocrinology* 103, 1153-1158
- 190.- Tell G.P.E., Cuatrecasas P., Van Wyde J. J., Hintz R. L. (1973) *Science* 180, 312-315.
- 191.- Sattin A., Rall T. W. (1970) *Molec. Pharmacol.* 6, 13-28.
- 192.- Londos G., Wolff J. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74, 5482-5486.

- 193.- Londres C., Cooper D.M.F., Schlegel W., Rodbell M. (1978)
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 5362-5366.
- 194.- Johnson R. A., Saur W., Jakobs K. H. (1979) J. Biol. Chem.
254, 1094-1101.
- 195.- Premont J., Guillon G., Bockaert J. (1979) Biochem. Biophys.
Res. Commun. 90, 513-519.
- 196.- Nalton A. F., Simko B. A. (1980) Biochim. Biophys. Acta. 615,
252-261.
- 197.- Hansson H. A., Holmgren J., Svenerholm L. (1977) Proc. Natl.
Acad. Sci. U.S.A. 74, 3782-3786.
- 198.- Mekalanos J. J., Collier R. J., Romig W. R. (1977) Infect.
Immun. 16, 789-795.
- 199.- Moss J., Vaugham M. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72,
4396-4400.
- 200.- Sahyoun N., Cuatrecasas P. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
72, 3438-3442.
- 201.- Moss J., Vaugham M. (1979) Ann. Rev. Biochem. 48, 581-600.
- 202.- Gill A. M., Evans A. J. Jr., Evans D. J. (1976) J. Infect.
Dis. 133:S, 103-107.
- 203.- Moss J., Richardson S. H. (1978) J. Clin Invest. 62, 281-
285.
- 204.- Moss J., Vaugham M. (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
75, 3621-3624.
- 205.- Moss J., Osborne J. C. Jr., Fishman P. M., Brewer M. B. Jr.,
Vaugham M., Brady R. O. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.
74, 74-78.
- 206.- Bergstrom S., Carlson L. A., Weeks J. R. (1968) Pharmacol.
Rev. 20, 1-48.
- 207.- Emmons P. R., Hampton J. R., Harrison M.J.C., Honour A. J.,
Mitchell J.R.A. (1967) Br. Med. J. 2, 468-472.
- 208.- Klueze (1967) Second Nobel Symposium Prostaglandins pp. 241-

- 252, Almquist and Wikzell. Stockholm.
- 209.- Mills D.C.J., Smith J.B. (1971) *Biochem. J.* 121, 185-196.
- 210.- Robinson G. A., Arnold A., Hartmann R.C. (1969) *Pharmacol. Res. Commun.* 1, 325-332.
- 211.- Salzman E. W., Levin L. (1971) *J. Clin. Invest.* 50, 131-141.
- 212.- Smith J. B., Silver M. J., Ingerman C. M., Kocsis J. J. (1974) *Tromb. Res.* 5, 291-294.
- 213.- Kuehl F. A. Jr. (1974) *Prostaglandins* 5, 325-340.
- 214.- Samuelsson B., Granström E., Green K., Hamberg M., Hamess-tröm S. (1975) *Ann. Rev. Biochem.* 44, 669-695.
- 215.- Jacquemin C. (1976) en "Eucaryotic Cell Function and Growth" (Dumond J.E., Brown B.L., Marshall N.J. eds.) 435-436 (Plenum Press, New York).
- 216.- Butcher R. W., Baird C. E. (1968) *J. Biol. Chem.* 243, 1713-1717.
- 217.- Kuehl F. A. Jr., Humes J. L., Tarnoff J., Cirillo V. J., Ham E. A. (1970) *Science* 169, 883-886.
- 218.- Sato S., Szabo M., Kowalski K., Burke G. (1972) *Endocrinology* 90, 343-356.
- 219.- Ortmann R., Perkins J. P. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 6018-6025.
- 220.- Brunton L.L., Wiklund R. A., Van Arsdale P. M., Gilman A. G. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 3037-3044.
- 221.- Kantor H. S., Tao P., Kiefer H. C. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 1317-1321.
- 222.- Hedqvist P. (1973) *Prostaglandins* 1, 101-132.
- 223.- Gorman R.R., Fitzpatrick F. A., Miller O. V. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 597-609.
- 224.- Salzman E. W., McIntyre D. E., Steer M. L., Gordon J. L. (1978) *Tromb. Res.* 13, 1089-1101.
- 225.- Anderson W. B., Gallo M., Pastan I. (1974) *J. Biol. Chem.*

- 249, 7041-7048.
- 226.- Blume A. J., Foster J. C. (1976) J. Biol. Chem. 251, 3399-3404.
- 227.- Anderson W. B., Mukku V.R., Johnson G. S. (1979) Arch. Biochem. Biophys. 197, 599-606.
- 228.- Haga T., Ross E. M., Anderson H. J., Gilman A. G. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 2016-2020.
- 229.- Strewler G.J., Orloff J. (1977) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 8, 311-361.
- 230.- Moore W. V., Wolff J. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6255-6263.
- 231.- Rethely A., Tomasi V., Trevisani A. (1971) Arch. Biochem. Biophys. 147, 36-40.
- 232.- Pohl S. L., Krans H.M.J., Kozyreff V., Birnbaumer L., Rodbell M. (1971) J. Biol. Chem. 246, 4447-4454.
- 233.- Levey G. S. (1971) J. Biol. Chem. 246, 7405-7410.
- 234.- Levey G. S. (1971) Biochem. Biophys. Res. Commun. 43, 108-113.
- 235.- Levey G. S., Klein I. (1972) J. Clin. Invest. 51, 1578-1582.
- 236.- Rubalcava B., Rodbell M. (1973) J. Biol. Chem. 248, 3831-3837.
- 237.- Lad P. M., Preston M. J., Welton A. F., Nielsen J. B., Rodbell M. (1979) Biochim. Biophys. Acta 551, 368-381.
- 238.- Puchwein G., Pfeuffer T., Helmreich E.J.M. (1974) J. Biol. Chem. 249, 3132-3240.
- 239.- Engelhard V. H., Glasser M., Storm D. R. (1978) Biochemistry 17, 3191-3200.
- 240.- Engelhard V. H., Esko J. D., Storm D. R., Glasser M. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 4482-4486.
- 241.- Kreiner P. W., Keirns J. J., Bitensky M. W. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 1785-1789.
- 242.- Bär H. P. (1974) Molec. Pharmacol. 20, 597-614.

- 243.- Rene E., Pecker F., Stengel D., Hanoune J. (1978) J. Biol. Chem. 253, 838-841.
- 244.- Salmon C., Deleau-la Belle N., Fontaine Y. A. (1974) Biochimie 56, 1229-1238.
- 245.- Houslay M. D., Palmer R. W. (1978) Biochem. J. 174, 909-919.
- 246.- Dipple I., Houslay M. (1978) Biochem. J. 174, 179-190.
- 247.- Dipple I., Houslay M. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 90, 663-666.
- 248.- Houslay M. D., Hesketh T. R., Smith G. A., Warren G. B., Metcalfe J. C. (1976) Biochim. Biophys. Acta 436, 495-504.
- 249.- Houslay M. D., Metcalfe J. C., Warren G. B., Hesketh T. R., Smith G. A. (1976) Biochim. Biophys. Acta 436, 489-494.
- 250.- Bakarogiera A., Galla M. J., Helmreich E.J.M. (1979) Biochemistry 18, 3016-3023.
- 251.- Orly J., Schramm M. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3433-3437.
- 252.- Hanski E., Rimon G., Levitzki A. (1979) Biochemistry 18, 846-853.
- 253.- Rimon G., Hanski E., Braun S., Levitzki A. (1978) Nature 276, 394-396.
- 254.- Malgieri J. A., Shepherd R. E., Fain J. N. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6593-6598.
- 255.- Fain J. N., Sheferd R. E. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6586-6592.
- 256.- Shier W. J., Baldwin J. H., Hamilton M. N., Hamilton R. T., Thanassi N. M. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1586-1590.
- 257.- Tao M., Lipmann F. (1969) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 63, 86-92.
- 258.- Harwood J. P., Peterkofsky A. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4656-4662.

- 259.- Makman R. S., Sutherland E. W. (1965) J. Biol. Chem. 240, 1309-1314.
- 260.- Peterkofsky A. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9, 611-619.
- 261.- Hewlett E., Wolff J. (1976) J. Bacteriol. 127, 890-898.
- 262.- Peterkofsky A. (1977) Trends Biochem. Sci. 2, 12-14.
- 263.- Peterkofsky A., Gazdar C. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 2324-2328.
- 264.- Umezawa K., Takai K., Tsuji S., Kurashina Y., Hayaishi O. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 4598-4601.
- 265.- Peterkofsky A., Gazdar C. (1975) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 2920-2924.
- 266.- Harwood J. P., Gazdar C., Prasad C., Peterkofsky A., Curtis S. J., Epstein W. (1976) J. Biol. Chem. 251, 2462-2468.
- 267.- Peterkofsky A., Harwood J. P., Gazdar C. (1975) J. Cyclic Nucleotide Res. 1, 11-20.
- 268.- Postma P. W., Roseman S. (1976) Biochim. Biophys. Acta 457, 213-257.
- 269.- Peterkofsky A., Gonzalez J. E., Gazdar C. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 188, 47-55.
- 270.- Gonzalez J. E., Peterkofsky A. (1977) J. Supramol. Struct. 6, 495-502.
- 271.- Hewlett E. L., Wolff J., Mandark C. R. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9, 621-628.
- 272.- Lynch T. J., Tallant E. A., Cheung W. Y. (1975) J. Bacteriol. 124, 1106-1112.
- 273.- Rosen O. M., Rosen S. M. (1968) Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 82-91.
- 274.- Schmidt M. J., Palmer E. C., Dettbarn W.D., Robinson G. A. (1970) Developmental Psychobiology 3, 53-67.

- 275.- Giudicelli Y., Pecquery R. (1978) Eur. J. Biochem. 90, 413-419.
- 276.- Sicard R. E., Aprille J. R. (1977) Biochim. Biophys. Acta 500, 235-245.
- 277.- Nijjar M. S. (1979) Biochim. Biophys. Acta 584, 43-50.
- 278.- Pecker F., Hanoune J. (1977) J. Biol. Chem. 252, 2784-2786.
- 279.- Pecker F., Hanoune J. (1977) Febs. Lett. 83, 93-98.
- 280.- Sanders R. B., Thompson W. J., Robinson G. A. (1977) Biochim. Biophys. Acta 498, 10-20.
- 281.- Doberska C. A., Martin W. J. (1977) Febs. Lett. 82, 273-277.
- 282.- Londos C., Salomon Y., Lin M. C., Harwood J. P., Scharmm M., Wolff J., Rodbell M. (1974) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 71, 3087-3090.
- 283.- Mersmann H. J., Phinney G., Brown L. J., Steffen D. G. (1977) Biol. Neonate. 32, 266-274.
- 284.- Ericsson E. (1973) Acta Physiol Scand 89, suppl. 396, 10.
- 285.- Bär H. P., Hahn P. (1971) Can. J. Biochem. 49, 85-89.
- 286.- Christoffersen T., Morland J., Osnes J. B., Øye I. (1973) Biochim. Biophys. Acta 313, 338-349.
- 287.- Vinicor F., Higden G., Clark J. F., Clark Jr. C.M. (1976) J. Clin. Invest. 58, 571-578.
- 288.- Hommes F. A., Beare A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 237, 296-300.
- 289.- Steiner A. L., Ferrendelli J. A., Kipnis D. M. (1972) J. Biol. Chem. 247, 1121-1124.
- 290.- Novak E., Drummond G. I., Skala J., Hahn P. (1972) Arch. Biochem. Biophys. 150, 511-518.
- 291.- Braun T., Hechter O. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 66, 995-1001.
- 292.- Palmer G. C. (1972) Biochem. Pharmacol. 21, 2907-2914.
- 293.- Weiss B. (1971) J. Neurochem 18, 469-477.

- 294.- Palmer G. C., Schmidt M. J., Robinson G. A: (1972) J. Neurochem. 19, 2251-2256.
- 295.- Perkins J. P., Moore M. M. (1973) Molec. Pharmacol. 9, 774-782.
- 296.- Makman M. H., Brown J. H., Mishra R. K. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 661-679.
- 297.- Burk R. R. (1968) Nature 219, 1272-1275.
- 298.- Olten J., Johnson G. S., Pastan I. (1971) Biochem. Biophys. res. Commun. 44, 1192-1198.
- 299.- Sheppard J. R. (1972) Nature 236, 14-16.
- 300.- Carchman R. A., Johnson G. S., Pastan I., Scolnick E. M. (1974) Cell 1, 59-64.
- 301.- Anderson W. B., Pastan I. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 681-698.
- 302.- Hsie A. W., Puck T. T. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 358-361.
- 303.- Sheppard J. R. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 1316-1320.
- 304.- Johnson G. S., Friedmann R. M., Pastan I. (1971) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 68, 425-429.
- 305.- Olten J., Johnson G. S., Pastan I. (1972) J. Biol. Chem. 247, 7082-7087.
- 306.- Anderson W. B., Russell T. R., Carchman R. A., Pastan I. (1973) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 3802-3805.
- 307.- Burger M. M., Bombick B. M., Brekendridge B. M., Sheppard J. R. (1972) Nature 239, 161-163.
- 308.- MacManus J. P., Whitfield J. F., Boyton A. L., Rixon R. H. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 719-734.
- 309.- Dubelco R., For-Mem R. S., Okada S. (1980) Proc. R. Soc. Lond. B208, 399-408.

- 310.- Lever J. E. (1979) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 1323-1327.
- 311.- Gingle A. R. (1976) J. Cell Sci. 20, 1-20.
- 312.- Gingle A. R. (1971) Devl. Biol. 58, 394-401.
- 313.- Ryan W. L., Heidrich M. L. (1974) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 4, 81-116.
- 314.- Maguire M. E., Slurgill T. W., Anderson H. J., Minna J. D., Gilman A. G. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 609-718.
- 315.- Chlapowski F. J., Kelly L. A., Butcher R. W. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 6, 245-338.
- 316.- Friedman D, L., Lohanson R. A., Zeilig C. E. (1976) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 7, 69-114.
- 317.- Rochette-Egly C., Castagna M. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 86, 937-944.
- 318.- Bourne H. R., Coffino P., Melmon K. L., Tomkins G. M., Weinstein Y. (1975) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 5, 771-785.
- 319.- White A. A., Aurbach G. D., Carlson S. F. (1969) Fed. Proc. 28, 473.
- 320.- Gray J. P., Drummond G. I., Kuk D. W. (1976) Arch. Biochem. Biophys. 172, 20-30.
- 321.- Goldberg N. D., O'Dea R. F., Haddox M. K. (1973) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 3, 155-223.
- 322.- Kimura M. Murad F. (1975) Life Sci. 17, 837-844.
- 323.- Filburn C. R., Wyatt G. R. (1976) Biochim. Biophys. Acta 22, 1635-1640.
- 324.- Fallon A. M., Wyatt G. R. (1977) J. Insect. Physiol. 23, 1037-1041.
- 325.- Catalán R. E., Catillón M. P., Múncio A. M. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 69, 914-919.
- 326.- Sulakhe P.V., Sulakhe S. J., Leung N.L.K., St. Louis P. J., Hickie R. A. (1976) Biochem. J. 157, 705-712.

- 327.- Sun I. C., Shapiro L., Rosen O. M. (1974) Biochem. Biophys. Res. Commun. 61, 193-203.
- 328.- Silverman P. M. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 70, 381-388.
- 329.- Macchic V., Varrone S., Weissbach H., Miller D. L., Pastan I. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6214-6217.
- 330.- Haddox M. K., Stephenson J. M., Goldberg N. D. (1974) Fed. Proc. 33, 522.
- 331.- Böhme E., Jung R., Mechler I. (1974) Methods Enzymol. 38C., 199-202.
- 332.- Frey W.H. II, Borman B. M., Newman D., Goldberg N. D. (1976) Fed. Proc. 35, 1730.
- 333.- Gray J. P., Hardman J. G., Bibring T., Sutherland E. W. (1970) Fed. Proc. 29, 608.
- 334.- Goldberg N. D., Haddox M. K. (1977) Ann. Rev. Biochem. 46, 823-896.
- 335.- Garbers D. L. (1976) J. Biol. Chem. 251, 4071-4077.
- 336.- Neer E. J. (1976) J. Supramol. Struct. 4, 51-61.
- 337.- Asano T., Hidaka H. (1977) Biochem. Biophys. Res. Commun. 78, 910-918.
- 338.- Neer E. J., Sukiennik E. A. (1975) J. Biol. Chem. 250, 7905-7909.
- 339.- Chrisman T. D., Garber's D. L., Parks M. A., Hardman J. G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 374-381.
- 340.- Garbers D. L. (1979) J. Biol. Chem. 254, 240-243.
- 341.- Garbers D. L., Dyer E. L., Hardman J. G. (1975) J. Biol. Chem. 250, 382-387.
- 342.- Garbers D. L., Suddath J. L., Hardman J. G. (1975) Biochim. Biophys. Acta 377, 174-185.
- 343.- Mato J. M. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 88, 569-574.

- 344.- Mato J. M., Malchow D. (1978) *Febs Lett.* 90, 119-122.
- 345.- Kumakara K., Battaini F., Hoffman M., Sparo P. F., Trabucchi M. (1978) *Febs Lett.* 93, 231-234.
- 346.- Garbers D. L., Hardman J. G. (1975) *J. Biol. Chem.* 250, 2482-2486.
- 347.- Siegel M. I., Pucc G. A., Cuatrecasas P (1976) *Biochim. Biophys. Acta* 438, 310-323.
- 348.- Neer E. J. (1978) *J. Biol. Chem.* 253, 5808-5812.
- 349.- Wallach D., Pastan I. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 5802-5809.
- 350.- De Robertis F. R., Graven P. A. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 4651-4658.
- 351.- Kimura H. Mittal C. K., Murad F. (1976) *J. Biol. Chem.* 251, 7769- 7773.
- 352.- Kraska R. C., Stephenson J. H., Goldberg N. D. (1977) *Fed. Proc.* 36, 686.
- 353.- White A. A., Crawford K. M., Patt C. S., Lad P. J. (1976) *J. Biol. Chem.* 7304-7312.
- 354.- Goldberg N. D., Haddox M. K., Nicol S. E., Glass D. B., Sanford C. H., Kuelh F. A. Jr., Estensen R. D. (1975) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5, 307-330.
- 355.- Sandler J. A., Gallin J. L., Vaughan M. (1975) *J. Cell. Biol.* 67, 480-484.
- 356.- Clyman R. I., Blacksin A. S., Maganiello V. C., Vaughan M. (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 72, 3883-3887.
- 357.- Goldberg N. D., Graff G., Haddox M. K., Stephenson J. M., Glass D. B., Moser M. E. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 101-130.
- 358.- Murad F., Mittal C. K., Arnold W. P., Katsnki S., Kimura H. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 145-158.
- 359.- Böhme E., Graf H., Schultz G. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 131-143.

- 360.- Ignarro L. J., Ceck S. Y. (1975) J. Cyclic Nucleotide Res. 1, 283-292.
- 361.- Ignarro L. J., Gruetter C. A. (1980) Biochim. Biophys. Acta 631, 221-231.
- 362.- Glass D. B., Frey W.H. II, Carr D. W., Goldberg N. D. (1977) J. Biol. Chem. 252, 1279-1285.
- 363.- Glass D. B., Gerrard J. M., Townsend D., Carr D. W., White J. G., Goldberg N. D. (1977) J. Cyclic Nucleotide Res. 3, 37-44.
- 364.- Silver M. J., Smith J. B., Ingerman C., Kocair J. J. (1973) Prostaglandins 4, 863-875.
- 365.- Glass D. B., Carr D., Gerrard J., Townsend D., White J., Goldberg N. D. (1976) Fed. Proc. 35, 456.
- 366.- Limbird L. E., Lefkowitz R. S. (1975) Biochim. Biophys. Acta 377, 186-196.
- 367.- Shier W. T., Baldwin J. H., Nielsen-Hamilton M., Hamilton R. T., Thanassi N. M. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 73, 1586-1590.
- 368.- Kimura H., Murad F. (1974) J. Biol. Chem. 249, 6910-6916.
- 369.- Sulakhe S. J., Leung N.L.K., Sulakhe P. V. (1976) Biochem. J. 157, 713-719.
- 370.- Fuyimoto M., Okabayashi T. (1975) Biochem. Biophys. Res. Commun. 67, 1332-1336.
- 371.- White A. A., Lad P. J. (1975) Fed. Proc. 34, 232.
- 372.- Ho R. J., Sutherland E. W. (1971) J. Biol. Chem. 246, 6822-6827.
- 373.- Fain J. N., Butcher F. R. (1976) J. Cyclic Nucleotide Res. 2, 71-78.
- 374.- Asakawa T., Ruiz J., Snyder R., Scheinbaum I., Russell T. R., Ho R. J. (1975) Fed. Proc. 34, 616.
- 375.- Asakawa T., Johnson C., Ruiz J., Scheinbaum I., Russell T.

- R., Ho J. R. (1976) *Biochem. Biophys. Res Commun.* 72, 1335-1342.
- 376.- Field M., Graf L. H., Laird W. J., Smith P. L. (1978) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 75, 2800-2804.
- 377.- Hughes J. M., Murad F., Chang B., Cuerrant R. L. (1978) *Nature* 271, 755-762.
- 378.- Brasutis T. A., Schachter D. (1980) *Biochim. Biophys. Acta* 630, 152-156.
- 379.- Thompson W. J., Williams R. H., Little S. A. (1973) *Biochim. Biophys. Acta* 302, 329-337.
- 380.- Amer M. S. (1974) *Gastroenterology* 67, 333-337.
- 381.- Howell S. L., Montagne W. (1974) *Biochem. J.* 142, 379-384.
- 382.- Ichihara K., Larner J., Kimura H., Murad F. (1977) *Biochim. Biophys. Acta* 481, 734-740.
- 383.- Schultz G., Hardman J. G., Schultz K., Baird C. E., Sutherland E. W. (1973) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 70, 3889-3893.
- 384.- Schultz G., Hardman J. G. (1975) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 5, 338-351.
- 385.- Greaves M. F., Baumger S. (1972) *Nature* 235, 67-69.
- 386.- Hadden J. W., Hadden E. M., Sadlik J. R., Coffey R. G. (1976) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 73, 1717-1721.
- 387.- Hadden J. W., Johnson E. M., Hadden E. M., Coffey R. G., Johnson D. L. (1975) en "*Immune Recognition*" (Rosenthal A.S. ed.) 359-390 (Academic Press, New York).
- 388.- Coffey R. G., Hadden E. M., López C., Hadden J. W. (1978) *Adv. Cyclic Nucleotide Res.* 9, 661-676.
- 389.- Wedner H. J., Daukner R., Parker C. W. (1975) *J. Immunol.* 115, 1685-1687.
- 390.- Burlenon D. G., Sage H. J. (1976) *J. Immunol.* 116, 696-703.
- 391.- Weber T. H., Goldberg M. L. (1976) *Exp. Cell. Res.* 97, 432-

- 441.
- 392.- Catalán R. E., Catillón M. P., Municio A. M. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 65, 385-391.
- 393.- Applebaum S. W., Gilbert L. I. (1972) *Develop. Biol.* 27, 165-175.
- 394.- Castillón M. P., Catalán R. E., Municio A. M. (1973) *Febs. Lett.* 32, 113-115.
- 395.- Rojakovick A. S., March R. B. (1972) *Comp. Biochem. Physiol.* 43B, 209-215.
- 396.- Morishima I. (1980) *Comp. Biochem. Physiol.* 65B, 399-402.
- 397.- Morishima I. (1978) *J. Biochem.* 84, 1495-1500.
- 398.- Morishima I. (1979) *Agric. Biol. Chem.* 43, 1127-1131.
- 399.- Filburn C. R., Wyatt G. R. (1976) *J. Insect. Physiol.* 22, 1635-1640.
- 400.- Durham J. P. (1976) *Eur. J. Biochem.* 61, 535-544.
- 401.- Berridge M. J. (1970) *J. Exp. Biol.* 53, 171-186.
- 402.- Prince W. T., Berridge M. J. (1973) *J. Exp. Biol.* 58, 367-374.
- 403.- Prince W. T., Berridge M. J., Ramussen H. (1972) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 69, 553-557.
- 404.- Bodnaryk R. P. (1979) *Insect. Biochem.* 9, 155-162.
- 405.- Bodnaryk R. P. (1979) *Can. J. Biochem.* 57, 226-232.
- 406.- Harmar A. J., Horn A. R. (1977) *Molec. Pharmacol.* 13, 512-520.
- 407.- Leenders H. J., Willems G. J., Brendes H. D. (1970) *Exp. Cell. Res.* 63, 159-164.
- 408.- Taylor D. P., Newburg R. W. (1978) *Experientia* 34, 695.
- 409.- Nathanson J. A., Greengard P. (1974) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 71, 797-801.
- 410.- Nathanson J. A. (1976) en "Trace Amines and the Brain" (Usdin E. and Sandler M. eds.) 161-190. (Dekker, New York).

- 411.- Bodnaryk R. P. (1979) J. Neurochem. 33, 275-282.
- 412.- Vandeberg R. D., Mills R. R. (1975) J. Insect. Physiol. 21, 221-229.
- 413.- Felt B. T., Vande Berg J. S. (1977) J. Insect. Physiol. 23, 543-548.
- 414.- Vedeckis W. V., Gilbert L. I. (1973) J. Insect. Physiol. 19, 2445-2457.
- 415.- Catalán R. E., Vila T., Castellón M. P. (1976) Experientia 32, 843-844.
- 416.- Catalán R. E., Castellón M. P., Municio A. M. (1976) Biochem. Biophys. Res. Commun. 72, 184-189.
- 417.- Rasenich M. M., Neuburg M., Berry S. J. (1976) J. Insect. Physiol. 22, 1453-1456.
- 418.- Bodnaryck R. P. (1978) Insect. Biochem. 8, 383-387.
- 419.- Everson R. D., Feir D. (1976) J. Insect. Physiol. 22, 781-784.
- 420.- Vedeckis W. V., Bollenbacher W. E., Gilbert L. I. (1976) Molec. Cell. Endocrinol. 5, 81-88.
- 421.- Fuchs M. S., Schlaeger D. A. (1973) Biochem. Biophys. Res. Commun. 54, 784-789.
- 422.- Seligman M., Blechl A., Blechl J., Herman P., Fraenkel G. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 4697-4701.
- 423.- Fraenkel G., Blechl A., Blechl J., Herman P., Seligman M.I. (1976) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 2182-2186.
- 424.- Burke G. (1970) Biochim. Biophys. Acta 220, 30-41.
- 425.- Fallon A. M., Wyatt G. R. (1975) Biochim. Biophys. Acta 441, 173-185.
- 426.- Delinger D. L., Wingard P. (1978) J. Insect Physiol. 24, 715-719.
- 427.- Bodnaryck R. P. (1975) Life Sci. 16, 1411-1416.
- 428.- Spruill W. A., Hurzwitz D. R., Lucchesi J. C., Steiner A.L.

- (1978) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 75, 1480-1484.
- 429.- Fallón A. M., Wyatt G. R. (1975) Anal. Biochem. 63, 614-619.
- 430.- Fernandez-Sousa J. M., Municio A. M., Ribera A. (1971) Biochim. Biophys. Acta 231, 527-534.
- 431.- Catalán R. E., Municio A. M. (1965) Nature 208, 1227-1228.
- 432.- Brown B. L., Albano J.D.M., Eckins R. P., Sgherzi A. M. (1971) Biochem. J. 121, 561-562.
- 433.- Gilman A. G. (1970) Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 67, 305-312.
- 434.- Albano J.D.M., Maudsley D. V., Brown B. L., Barnes G. D. (1973) Biochem. Soc. Trans. 1, 477-479.
- 435.- Sun Y. I., Shaphtro L., Rosen O. M. (1975) J. Biol. Chem. 250, 6181-6184.
- 436.- Brown B. L., Albano J.D.M., Barnes G. D., Ekins R. P. (1974) Biochem. Soc. Trans. 2, 388-390.
- 437.- White A. A., Zenser T. V. (1971) Anal. Biochem. 41, 372-396.
- 438.- Krishna G., Birnbaumer L. (1970) Anal. Biochem. 35, 393-397.
- 439.- Schultz G., Böhme E., Hardman J. G. (1974) Methods Enzymol. 31A, 9-20.
- 440.- Chan P. S., Lin M. C. (1974) Methods Enzymol. 31A, 38-41.
- 441.- Bligh E. G., Dyer W. J. (1959) Can. J. Biochem. Physiol. 37, 911-917.
- 442.- Bolliger H. R., Brenner M., Gänshirt H., Mangold H. K., Seiler H., Stahl E., Waldi D. (1965) en "Thin Layer Chromatography" (Stahl E. ed.) 451 (Academic Press, Inc. Publishers, New York).
- 443.- Holoway P. W. (1973) Anal. Biochem. 53, 304-308.
- 444.- Catalán R. E., Castellón M. P., García J. L., Haro A., Periañez S. (1979) Biochem. Biophys. Res. Commun. 89, 800-805.
- 445.- Khandelwal R. J., Vandenheede J. R., Krebs E. G. (1976) J.

- Biol. Chem. 251, 4850-4858.
- 446.- Maeno H. Greengard P. (1972) J. Biol. Chem. 247, 3269-3277.
- 447.- Lowry O. H., Rosenbrough N.J., Farr A. L., Randall R. (1951)
J. Biol. Chem. 193, 265-275.
- 448.- Dulley J. R., Grieve P. A. (1975) Anal. Biochem. 64, 136-
141.
- 449.- Thompson W. J., Williams R. H., Little S. A. (1973) Arch.
Biochem. Biophys. 169, 206-213.
- 450.- Sinha A. K., Colman R. W. (1977) Experientia 33, 301-302.
- 451.- Madsen S. W., Badawi I., Scovsted L. (1976) Acta Endocri-
nol. 81, 208-214.
- 452.- Lust W. D., Dye E., Deaton A. V., Passoneau J. V. (1976)
Anal. Biochem. 72, 8-15.
- 453.- Walton G. M., Garren L. D. (1970) Biochemistry 9, 4223-4229.
- 454.- Tovey K. C., Oldham K. G., Whelan J.A.M. (1974) Clinica
Chimica Acta 56, 221-234.
- 455.- Weller M., Rodnight R., Carrera D. (1972) Biochem. J. 129,
113-121.
- 456.- Schwabe U., Ebert R., Schönhöger P. S. (1974) Naunyn-Schi-
miedeberg's Arch. Pharmacol. 286, 83-96.
- 457.- Kimura H., Mittal C. K., Murad F. (1975) J. Biol. Chem.
250, 8016-8022.
- 458.- Adams A. F., Haslam R. J. (1978) Biochem. J. 174, 23-35.
- 459.- Levilliers J., Pairault J., Lecot F., Tournemolle A., Lau-
dat M. H. (1978) Eur. J. Biochem. 88, 323-330.
- 460.- Nesbitt III J. A., Anderson W. B., Miller Z., Pastan I., Ru-
ssel T. R., Gospodarowicz D. (1976) J. Biol. Chem. 251,
2344-2352.
- 461.- Hunt W. A., Redos J. D., Dalton T. K., Catravas G. N. (1977)
J. Pharmacol. Exp. Ther. 201, 103-109.
- 462.- Steiner A. L., Koide Y., Earp H. S., Bechtel P. J., Beavo

- J. A. (1978) Adv. Cyclic Nucleotide Res. 9, 691-705.
- 463.- Tsuzuki J., Kijer Jr. J.A. (1975) Biochim. Biophys. Acta 393, 225-235.
- 464.- Walter U., Kanof P., Schulman H., Greengard P. (1978) J. Biol. Chem. 253, 6275-6280.
- 465.- Tirard A., Roques M. (1978) Biochim. Biophys. Acta 537, 485-494.
- 466.- Krakow J. S. (1975) Biochim. Biophys. Acta 383, 345-350.
- 467.- Londesboroug J., Nurminen J. (1972) Acta Chem. Scand. 26, 3396-3398.
- 468.- Varimo K., Londesborough J. (1979) Febs Lett. 106, 153-156.
- 469.- Yamamura H., Rodbell M., Fain J. N. (1976) Molec. Pharmacol. 12, 693-700.
- 470.- Yamamura H., Rodbell M., Fain J. N. (1976) J. Biol. Chem. 252, 7964-7966.
- 471.- Weinryb I., Michel I. M. (1974) Biochim. Biophys. Acta 334, 218-225.
- 472.- Wolff J., Londos C., Cook G. H. (1978) Arch. Biochem. Biophys. 191, 161-168.
- 473.- Salomon Y., Lin M., Londos C., Rendell M., Rodbell M. (1975) J. Biol. Chem. 250, 4239-4245.
- 474.- Whitehead D. L. (1969) Nature 224, 721-723.
- 475.- Lake C. R., Mills R. R., Brunet P. C. I. (1970) Biochim. Biophys. Acta 215, 226-228.
- 476.- Molinoff P. B., Axelrod J. (1972) Neurochem. 19, 157-163.
- 477.- Clement-Corrier Y. C., Parrish R. G., Petzold G. L., Kebabian J. W., Greengard P. (1975) J. Neurochem. 25, 143-149.
- 478.- Swislocki N. I., Tierney J. (1973) Biochemistry 12, 1862-1863.
- 479.- Young J. L., Stanfield D. A. (1978) Biochem. J. 173, 919-

- 924.
- 480.- Young J. L., Stanfield D. A. (1978) *Biochem. J.* 169, 133-142.
- 481.- Welton A. F., Lad P. M., Newby A. C., Yamamura H., Nicosia S., Rodbell M. (1978) *Biochim. Biophys. Acta* 522, 625-639.
- 482.- Pilanski M., Voigt K. D., Walter W. (1979) *Biochim. Biophys. Acta* 582, 380-389.
- 483.- Franks D. J., Malamud D. (1976) *Anal. Biochem.* 73, 486-492.
- 484.- Levey G. S. (1974) *Methods Enzymol.* 31A, 174-178.
- 485.- Limbird L. E., Lefkowitz R. J. (1977) *J. Biol. Chem.* 252, 799-802.
- 486.- Marcus R., Aurbach G. D. (1971) *Biochim. Biophys. Acta* 242, 410-421.
- 487.- Dousa T., Hechler O. (1970) *Life Sci.* 9, 765-770.
- 488.- Forn J., Valdecasas F. G. (1971) *Biochem. Pharmacol.* 20, 2773-2779.
- 489.- Haro A. (1980) Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid.

